

**Universidad Autónoma de Madrid**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Medicina**



**RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ENDOSCÓPICA E  
HISTOLÓGICA, EL DESARROLLO MICROVASCULAR Y LA  
EXPRESIÓN DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS Y  
LINFANGIOGÉNICOS EN LA MUCOSA CÓLICA DE PACIENTES  
CON ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL**

**TESIS DOCTORAL**

**Pablo Muñoz Linares**

**Directores:**

**Javier P. Gisbert**

**María Chaparro**

**Servicio de Aparato Digestivo.**

**Hospital Universitario de La Princesa**



## AGRADECIMIENTOS

Al finalizar un trabajo tan laborioso y lleno de dificultades como es la elaboración de una tesis, es inevitable no sentirse orgulloso de plasmar sobre el papel los conocimientos sobre las enfermedades inflamatorias intestinales, aprendidos durante los ocho años que han pasado desde que empecé a trabajar en el Hospital de La Princesa.

Este trabajo me ha permitido aprovechar la competencia y la experiencia de muchas personas que deseo agradecer en este apartado. A las Dras. Encarnación Fernández y Alicia Algaba, sin cuya colaboración, difícilmente hubiera podido llevar a cabo este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento al Prof. Dr. Javier P. Gisbert y a la Dra. María Chaparro, directores de este trabajo, que con su envidiable entusiasmo permanente, capacidad de trabajo y generosidad han conseguido despertar mi curiosidad por la investigación clínico-básica; así como, por haberme brindado la oportunidad de ser miembro de su grupo de investigación desde los inicios de mi trayectoria profesional.

Por último, no puedo olvidar a mis compañeros de la Unidad de EII, con los cuales he compartido despacho, laboratorio e incontables horas de trabajo. Gracias por los buenos y malos momentos, por aguantarme y por escucharme. Por supuesto agradezco a Sara, a mi hermana Cristina y a mi familia por apoyarme durante todo este tiempo.

# ÍNDICE

I. RESUMEN / ABSTRACT .....	7
II. INTRODUCCIÓN.....	7
1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL .....	9
1.1 ENFERMEDAD DE CROHN.....	9
1.2 COLITIS ULCEROSA .....	10
1.3 FACTORES DE RIESGO .....	11
1.4 ETIOLOGÍA.....	11
2. ANGIOGÉNESIS Y LINFANGIOGÉNESIS.....	12
2.1 FACTORES DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR Y SUS RECEPTORES.....	13
2.1.1 Factor de crecimiento del endotelio vascular –A (VEGF-A) .....	15
2.1.2 Factor de crecimiento del endotelio vascular –C (VEGF-C).....	18
2.1.3 Factor de crecimiento del endotelio vascular –D (VEGF-D).....	19
2.1.4 Factor de crecimiento placentario (PLGF) .....	20
2.2 RECEPTORES DE FACTORES DE CRECIMIENTO .....	22
2.2.1 Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular -1 (VEGFR-1).....	22
2.2.2 Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular -2 (VEGFR-2).....	23
2.2.3 Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular -3 (VEGFR-3).....	23
2.3 ANGIOPOYETINAS .....	25
2.3.1 Angiopoyetina-1 .....	27
2.3.2 Angiopoyetina-2 .....	28
2.3.3 Papel de angiopoyetinas en la EII .....	29
2.3.4 Otros factores de crecimiento linfangiogénico en la EII.....	31
III. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS .....	33
1. HIPÓTESIS PRINCIPAL .....	34
2. OBJETIVOS .....	34
IV. PACIENTES Y MÉTODOS .....	36
1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....	37
1.1 PACIENTES Y CONTROLES.....	37
1.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	37
1.3 PROCESADO DE MUESTRAS PARA HISTOPATOLOGÍA .....	38
2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA EII .....	39
2.1 ACTIVIDAD ENDOSCÓPICA DE LA EII .....	39
2.2 ACTIVIDAD HISTOLÓGICA DE LA EII .....	41
4. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO .....	42
5. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE MARCADORES DE CÉLULAS ENDOTELIALES.....	43
5.1 DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE CD34 .....	43
5.2 DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA MOLÉCULA D2-40 .....	45
6. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS Y LINFANGIOGÉNICOS .....	47
6.1 DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE ANG-1, ANG-2 Y TIE-2 .....	47
6.2 DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, PLGF, VEGFR-1, VEGFR-2 Y VEGFR-3.....	49
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	51
7.1 BASE DE DATOS .....	51
7.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	52
V. RESULTADOS.....	54
1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES.....	55
2. DENSIDAD CAPILAR Y EII.....	56
3. DENSIDAD MICROVASCULAR EN TEJIDO NORMAL DE CONTROLES FRENTE A TEJIDO DE PACIENTES CON EII INACTIVA.....	62
4. DENSIDAD MICROVASCULAR EN CU FRENTE A EC .....	63
5. DENSIDAD DE LA MICROVASCULATURA Y ACTIVIDAD DE LA EII .....	66
6. GRAVEDAD DE LA ACTIVIDAD DE LA EII.....	68
7. CORRELACIONES ENTRE LA ACTIVIDAD ENDOSCÓPICA E HISTOLÓGICA, Y EL MARCAJE CAPILAR.....	73
8. EXPRESIÓN DE ANG-1 COMO FACTOR DE DESARROLLO ANGIOGÉNICO DE LA EII.....	73
VI. DISCUSIÓN .....	76
VII. CONCLUSIONES .....	88
VIII. BIBLIOGRAFÍA .....	90
IX. ANEXOS .....	105

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad endoscópica de la EII.....	39
Tabla 2. Subíndice endoscópico de Mayo para CU .....	40
Tabla 3. Índice de SES-CD para la enfermedad de Crohn .....	40
Tabla 4. Clasificación Índice SES-CD .....	40
Tabla 5. Clasificación Índice D'Haens para la actividad histológica de la EC .....	41
Tabla 6. Clasificación Índice Riley para la actividad histológica de la CU.....	42
Tabla 7. Anticuerpos empleados.....	42
Tabla 8. Características de los pacientes.....	55
Tabla 9. Densidad capilar en pacientes con EII y controles sanos .....	57
Tabla 10. Expresión del marcaje VEGF en pacientes con EII y controles sanos.....	57
Tabla 11 Densidad capilar de D2.40, CD34 y angiopoyetinas positivos en muestras sin actividad y controles .....	63
Tabla 12. Intensidad del marcaje del sistema VEGF en muestras sin actividad y controles .....	63
Tabla 13. Densidad de microvasos y angiopoyetinas en las muestras con actividad endoscópica frente a las inactivas, por tipo de EII. ....	64
Tabla 14. Expresión del sistema VEGF en las muestras con actividad endoscópica frente a las inactivas, por tipo de EII.....	64
Tabla 15. Densidad de microvasos y angiopoyetinas en las muestras con actividad histológica frente a las inactivas, por tipo de EII. ....	64
Tabla 16. Expresión del sistema VEGF en las muestras con actividad histológica frente a las inactivas, por tipo de EII.....	65
Tabla 17 Densidad de capilares D2.40, CD34 y angiopoyetinas positivos en muestras con EII activa frente a inactiva, determinada por criterios endoscópicos e histológicos. .	67
Tabla 18 Intensidad de tinción del sistema VEGF en muestras de pacientes con CU y EC activa frente a inactiva, como se determinó por criterios endoscópicos e histológicos....	67
Tabla 19. Grado de actividad endoscópica de los pacientes, e histológica de los pacientes y las muestras de tejido. ....	69
Tabla 20 Densidad capilar e intensidad del marcaje según el grado de actividad histológica de la EII. ....	70
Tabla 21 Densidad capilar e intensidad del marcaje según el grado de actividad endoscópica de la EII .....	70

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la microvasculatura linfática.....	13
Figura 2. Sistema VEGF y sus receptores. ....	14
Figura 3. Representación esquemática de la posible vía de señalización de Ang/Tie-2 entre las células endoteliales, musculares lisas y pericitos.....	26
Figura 4. Densidad capilar de D2.40, CD34 y angiopoyetinas positivos, e intensidad del marcaje del sistema VEGF en muestras de pacientes con EII y controles. ....	58
Figura 5 Positividad con A) D2-40, B) CD34, C) Ang-1, D) Ang-2 y E) Tie-2 en las membranas celulares y en los endotelios vasculares de pacientes con EII activa. ....	59
Figura 6. Positividad con 6A) VEGF-A, 6B) PlGF, 6C) VEGF-C, 6D) VEGF-D, 6E) VEGFR-1, 6F) VEGFR-2 y 6G) VEGFR-3 en las membranas celulares y en los endotelios vasculares de pacientes con EII activa. ....	61
Figura 7. Densidad capilar de D2.40, CD34, Angiopoyetinas positivos (7A), e intensidad del marcaje del sistema VEGF (7B) en muestras de pacientes con CU y pacientes con EC.....	65
Figura 8. Densidad capilar de D2.40, CD34, Angiopoyetinas positivos, e intensidad del marcaje del sistema VEGF según el grado de actividad endoscópica (8A y 8B) e histológica (8C y 8D) de la EII. ....	71
Figura 9. Área bajo la curva COR de Ang-1 como predictor de actividad endoscópica en pacientes con EII (9A) y CU (9B). ....	74

## **ABREVIATURAS**

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal

CU: Colitis ulcerosa

EC: Enfermedad de Crohn

VEGF-A: Factor de crecimiento del endotelio vascular-A

VEGF-C: Factor de crecimiento del endotelio vascular-C

VEGF-D: Factor de crecimiento del endotelio vascular-D

PIGF: Factor de crecimiento placentario

VEGFR-1: Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular-1

VEGFR-2: Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular-2

VEGFR-3: Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular-3

Ang-1: Angiopoyetina-1

Ang-2: Angiopoyetina-2

Tie-2: Receptor de angiopoyetinas-1

TNBS: ácido trinitrobenzeno-sulfónico

NF- $\kappa$ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

## **I. RESUMEN / ABSTRACT**

---



**RESUMEN**

**Objetivo:** Investigar la relación entre la angiogénesis y la linfangiogénesis en biopsias de mucosa intestinal y la actividad endoscópica e histológica de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

**Métodos:** Se incluyeron prospectivamente pacientes con y sin EII que acudieron a realizarse una colonoscopia por práctica clínica. El grado de actividad endoscópica se determinó mediante el subíndice endoscópico de Mayo para la colitis ulcerosa (CU) y el SES-CD para enfermedad de Crohn (EC). La expresión de los factores en mucosa cólica se determinó por inmunohistoquímica. Los resultados de la expresión de VEGF-A, -C, -D, -R1, -R2, -R3 y PIGF se clasificaron como sigue: (++) si se tiñeron más del 50% de las células del tejido, (+) por debajo del 50% y (-) tinción negativa. Ang-1, Ang-2 y Tie-2, y la densidad microvascular CD34 y D2.40, se evaluaron mediante el recuento directo en cinco campos de visión a un aumento de 40x.

**Resultados:** Se incluyeron 58 pacientes con EII (36 CU y 22 EC) y 19 controles, y se evaluó un total de 101 biopsias. Se observó una mayor expresión de Ang-1 y -2 en las biopsias procedentes de segmentos intestinales con inflamación endoscópica grave comparada con las procedentes de tramos sin actividad endoscópica ( $p<0,01$ ). La expresión de VEGF-D ( $p<0,05$ ), PIGF ( $p<0,05$ ) y VEGFR-3 ( $p<0,01$ ), y la media de recuento de Ang-1 ( $p<0,05$ ) y Ang-2 ( $p<0,01$ ), fueron diferentes en función de la actividad histológica. La intensidad de la expresión aumentó en paralelo con la gravedad de las lesiones histológicas, excepto la de VEGF-D, que disminuyó. La expresión y el recuento medio de Ang-1, Ang-2, VEGFR-2 ( $p<0,01$ ) y VEGF-C, -R1 y Tie-2 fueron mayores en las muestras de pacientes con CU que en las de EC ( $p<0,05$ ). En los pacientes con EC, el recuento medio de Ang-1, y la expresión de VEGF-C, -D, -R2, -R3 y PIGF fue mayor ( $p<0,05$ ), y del resto de los factores menor, que en los controles. La expresión de Ang-2 ( $p<0,05$ ) y la de todos los factores estudiados fue mayor en las muestras de EC activa que en las inactivas. La expresión de todos los factores fue mayor en los pacientes con CU que en los controles ( $p<0,05$ ). El recuento medio y la expresión de Ang-1, Ang-2 y VEGF-D fue menor ( $p<0,05$ ) en las muestras con CU activa. El mayor área bajo la curva ROC para el diagnóstico de actividad endoscópica en CU fue de 0,72 para la Ang-1 (punto de corte 42,2: sensibilidad 53% y especificidad 67%).

**Conclusiones:** La expresión de VEGF-A, -D, -R3, PIGF y Ang-1 y -2 en las biopsias de mucosa se correlaciona con la actividad histológica de la EII. La expresión de Ang-1 en muestras de mucosa constituye un marcador de desarrollo angiogénico en la EII. Los factores angiogénicos se expresan de manera diferente en la mucosa de los pacientes con EC y CU. Estos resultados sugieren un papel de estos factores en la actividad de la EII.

**ABSTRACT**

**Aim:** To evaluate the relationship between angiogenesis and lymphangiogenesis in colonic mucosa biopsies with the endoscopic and histological activity in patients with inflammatory bowel disease (IBD).

**Methods:** Patients with and without IBD that underwent a colonoscopy because of medical criteria were prospectively included. Endoscopic activity was assessed by endoscopic Mayo subscore for ulcerative colitis (UC) and SES-CD for Crohn's disease (CD). Protein expression in colonic mucosa was determined by immunohistochemistry. VEGF-A, -C, -D, -R1, -R2, -R3 and PIGF expression results were graded as follows: (++) over 50% of the tissue cells were stained, (+) below 50%, and (-) completely negative. Ang-1, Ang-2 and Tie-2, and micro vessel density CD34 and D2.40, were assessed as the average density of five hot spots at a magnification of x40.

**Results:** 58 patients with IBD (36 UC and 22 CD) and 19 controls were included, and a total of 101 biopsies were evaluated. Higher expression of Ang-1 and Ang-2 was found when the endoscopic activity was severe compared to inactive disease ( $p<0.01$ ). Expression of VEGF-D ( $p<0.05$ ), PIGF ( $p<0.05$ ) and VEGFR-3 ( $p<0.01$ ), and mean count of Ang-1 ( $p<0.05$ ) and Ang-2 ( $p<0.01$ ) were also significantly different depending on the histological activity. These expressions were increased in parallel with the severity of histological lesions excepting for VEGF-D, which was decreased with the severity of the activity. Expression and mean count of Ang-1, Ang-2, VEGFR-2 ( $p<0.01$ ), and VEGF-C, -R1 and Tie-2 were higher in samples from patients with UC compared to CD ( $p<0.05$ ). In patients with CD, Ang-1 mean count, and expression of VEGF-C, -D, -R2, PIGF, and VEGFR-3, were higher ( $p<0.05$ ), and the rest of factors were lower, than in controls. Expression of Ang-2 ( $p<0.05$ ) and of all the studied factors were higher in active samples than in non-active CD; on the opposite, VEGF-D and -R3 were lower. In UC, expression of all factors were higher in patients with UC than in controls ( $p<0.05$ ). Mean count and expression of Ang-1, Ang-2 were higher, and VEGF-D was lower ( $p<0.05$ ) in samples with active, compared to inactive UC. The best area under the ROC curve for the diagnosis of endoscopic activity in UC was 0.72 for Ang-1 (cut-off at 42.2: 53% sensitivity and 67% specificity).

**Conclusions:** The expression of VEGF-A, -D, -R3, PIGF, and Ang-1 and -2 in mucosal biopsies correlates with the histological activity of IBD. Ang-1 expression in mucosal samples is a marker of angiogenic development in IBD. Angiogenic factors are differentially expressed in mucosa from patients with CD and UC. These findings might support a role of angiogenic factors in IBD activity.

## II. INTRODUCCIÓN

---

## **II. INTRODUCCIÓN**

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) engloba tres entidades distintas: la enfermedad de Crohn (EC), la colitis ulcerosa (CU) y la colitis indeterminada (CI), cuya característica principal es la inflamación crónica del tubo digestivo en diferentes localizaciones<sup>1,2</sup>.

La EC y la CU, a pesar de ser diferentes entre sí, tienen características comunes que en muchas ocasiones hacen difícil diferenciarlas. Para realizar el diagnóstico diferencial entre EC y CU es necesario apoyarse en las características clínicas, endoscópicas, radiológicas, histológicas y en la evolución de la enfermedad a lo largo del tiempo.

Tanto la EC como la CU cursan alternando periodos de actividad clínica de diferente intensidad que se denominan brotes o recidivas, caracterizados por un aumento y agudización de la respuesta inflamatoria, con periodos de inactividad o quiescencia que se identifican con las fases de remisión. El número, la periodicidad y la gravedad de estos brotes son impredecibles.

Los síntomas y la gravedad de cada una de estas enfermedades dependerán de la extensión, la localización, el comportamiento, el grado de actividad inflamatoria y de las manifestaciones extraintestinales que se asocian a la enfermedad, aspectos que le confieren una importante heterogeneidad clínica y que obligan a subclasificarlas<sup>3</sup>.

## **1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL**

### **1.1 ENFERMEDAD DE CROHN**

La EC puede afectar a cualquier parte del tracto digestivo desde la boca hasta el ano, aunque se localiza con más frecuencia en íleon terminal y colon. Su distribución es segmentaria a lo largo del intestino, lo que significa que existen áreas del intestino preservadas de la enfermedad entre los segmentos del intestino que están afectados y que tienen una longitud variable. Además, esta inflamación es asimétrica a lo largo de la circunferencia del tracto digestivo y de las diferentes localizaciones de la enfermedad. La EC es una enfermedad transmural, por lo que la inflamación afecta a todo el espesor de la pared intestinal, desde la mucosa hasta la vertiente de la serosa que recubre el intestino. La pared intestinal se encuentra engrosada con afectación de la submucosa, la *muscularis propria*, la serosa y la grasa mesentérica<sup>4</sup>.

El rasgo histológico clave en la EC es el hallazgo de granulomas no caseificantes en el estudio microscópico, aunque éstos se pueden encontrar en otros procesos patológicos, fundamentalmente en infecciones por *Campylobacter* o *Yersinia* e incluso en las colitis secundarias a fármacos. Un granuloma se define como un conjunto de células epitelioides, macrófagos y linfocitos, habitualmente células T<sup>5</sup>. Otros hallazgos histológicos, menos específicos de la EC, son la presencia de distorsión de la cripta de forma discontinua, y la presencia de inflamación discontinua, cuando la enfermedad no ha sido tratada previamente con fármaco.

## **1.2 COLITIS ULCEROSA**

La CU afecta a la mucosa del colon en extensión variable, desde el recto hasta el ciego. La extensión de la CU tiene importantes implicaciones pronósticas y para la toma de decisiones en los algoritmos terapéuticos<sup>6</sup>. Por lo general, las lesiones son más intensas en el recto y se extienden a lo largo del colon aunque existen numerosas excepciones a esta regla. La indemnidad rectal se observa con más frecuencia en la CU tratada con medicación tópica (también se puede observar en casos en los que la enfermedad es más grave en otras áreas del colon y la mucosa rectal está conservada). La afectación intestinal es continua, a diferencia de lo que ocurre en la EC, que es discontinua. Varios estudios endoscópicos han puesto de manifiesto la existencia de inflamación del colon derecho y/o periapendicular en pacientes con colitis izquierda. La prevalencia de estos hallazgos varía entre el 19 y el 75%, pero no se sabe cuál es el significado clínico<sup>7</sup>. Puesto que la enfermedad se limita a la mucosa del colon, es excepcional la aparición de fístulas, estenosis o engrosamiento transmurales, como ocurre en la EC.

La característica histológica diferencial en el caso de la CU es que el proceso inflamatorio se limita a la mucosa. La lámina propia se encuentra congestiva, edematosa y con aumento del número de células. Existe un aumento de infiltrado inflamatorio que se extiende tanto lateral como verticalmente en la mucosa del colon. Además existe un abundante número de células plasmáticas que cuando se asocia a una distorsión de las criptas es muy sugerente de CU. Otra característica que ayuda al diagnóstico y que indica la presencia de enfermedad activa es la presencia de neutrófilos en la pared de las criptas (criptitis), en su interior (abscesos de las criptas) o asociados a daño epitelial (destrucción de las criptas). Pero los datos más relevantes para el diagnóstico de CU son los indicadores de cronicidad, como son la deformación arquitectónica y la atrofia de las criptas, aumento de la separación entre ellas con

disminución significativa de su número y la presencia de agregados linfoides basales e infiltrado inflamatorio crónico, todo ello asociado a la disminución de moco<sup>8</sup>.

### **1.3 FACTORES DE RIESGO**

Muchos han sido hasta ahora los factores ambientales relacionados con la EII, permaneciendo actualmente sin aclarar el mecanismo fisiopatogénico de cada uno de ellos; algunos de estos factores se comportan de manera totalmente diferente en la CU y en la EC, reforzando la hipótesis de que ambas entidades, aunque compartiendo algunas características clínicas y fisiopatológicas, son probablemente entidades heterogéneas (en realidad, muy probablemente sean más de dos entidades). Existe una evidencia científica cada día más amplia de que diferentes factores ambientales influyen en la aparición de las EII así como en la evolución posterior en su historia natural<sup>9</sup>. Después de los agentes infecciosos y la dieta, el tabaco, la apendicectomía y la toma de anticonceptivos orales son los factores que más frecuentemente se han asociado a la etiología de estas enfermedades<sup>10</sup>.

### **1.4 ETIOLOGÍA**

A diferencia de lo que ocurre con otros procesos que cursan con inflamación del tracto digestivo en los que existe una causa etiológica identificable, en la EII se desconoce. La teoría más aceptada es que existen factores genéticos, endógenos y ambientales, como la modificación de la flora bacteriana residente y el aumento de la permeabilidad intestinal, que juegan un importante papel en la mala regulación de la inmunidad intestinal, lo que lleva a lesión gastrointestinal, desencadenado toda la cascada de inflamación contra el propio tejido<sup>11-14</sup>.

Esta inflamación provoca una producción inapropiada de citocinas en la mucosa intestinal, iniciando un desarrollo angiogénico y linfangiogénico anormal<sup>15, 16</sup>. La liberación de factores pro-angiogénicos y linfangiogénicos, provoca una reacción

recíproca con las citocinas de la mucosa manteniendo el estado inflamatorio<sup>17, 18</sup>. Sin embargo, aunque la angiogénesis (el desarrollo de vasos sanguíneos) contribuye a intensificar la inflamación intestinal, todavía no está claro si la linfangiogénesis (el desarrollo de vasos linfáticos) amplifica o protege de la inflamación a los pacientes con EII<sup>19-21</sup>.

## **2. ANGIOGÉNESIS Y LINFANGIOGÉNESIS**

La angiogénesis se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes<sup>22</sup>. Este proceso se produce durante diversos procesos fisiológicos, por ejemplo, la embriogénesis, el ciclo reproductivo femenino, ciclo de crecimiento capilar, la curación de heridas o el crecimiento del tejido<sup>23, 24</sup>. En la angiogénesis fisiológica, después de la estabilización y estructuralización de la nueva red capilar formada, el equilibrio entre los factores pro- y antiangiogénicos vuelve a los niveles basales y el proceso termina<sup>25</sup>. Sin embargo, un desequilibrio entre reguladores positivos y negativos probablemente conduce a una angiogénesis patológica que puede promover enfermedades tales como el cáncer, la enfermedad cardiovascular isquémica, la retinopatía diabética y la artritis reumatoide<sup>26, 27</sup>.

A diferencia de los vasos sanguíneos, los vasos linfáticos llevan a cabo importantes funciones fisiológicas, incluyendo el drenaje del exceso de fluido corporal en los tejidos, la absorción de la grasa intestinal y el tráfico de células inmunes a través de los nodos linfáticos<sup>28, 29</sup> (Figura 1). Varios estudios han documentado la asociación de la linfangiogénesis con el crecimiento tumoral y metastásico<sup>30-32</sup>, sin embargo, su relación con la EII no está del todo demostrada.

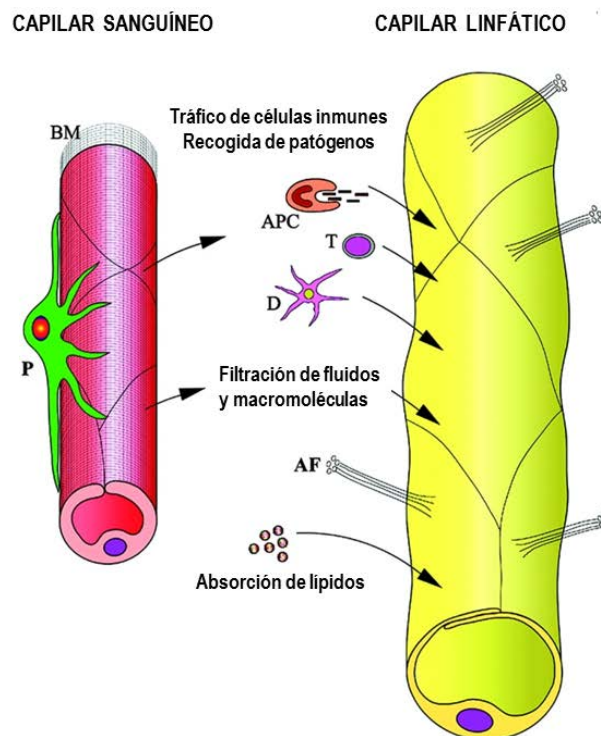
Recientes estudios bioquímicos, moleculares e inmunohistoquímicos, indican que varias familias de factores de crecimiento, tales como la del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y sus receptores, y el sistema de las angiopoyetinas pueden desempeñar un papel importante en la aparición de la EII<sup>33-38</sup>. Aunque hasta la



fecha, no se ha estudiado la expresión de estos factores con el crecimiento angiogénico y linfangiogénico a nivel tisular, en pacientes con EII.

Figura 1. Estructura de la microvasculatura linfática.

El capilar linfático está adaptado para la absorción de fluido, lípidos, macromoléculas, células y desde la zona intersticial. En contraste con el capilar sanguíneo, el capilar linfático desarrolla una pobre lámina basal (BM) y se encuentra desprovisto de pericitos (P). El endotelio linfático está altamente atenuado, y las células se conectan directamente al colágeno intersticial mediante filamentos de anclaje (AF). La ausencia de una barrera vascular de músculo liso permite el paso de células inmunes al sistema linfático.



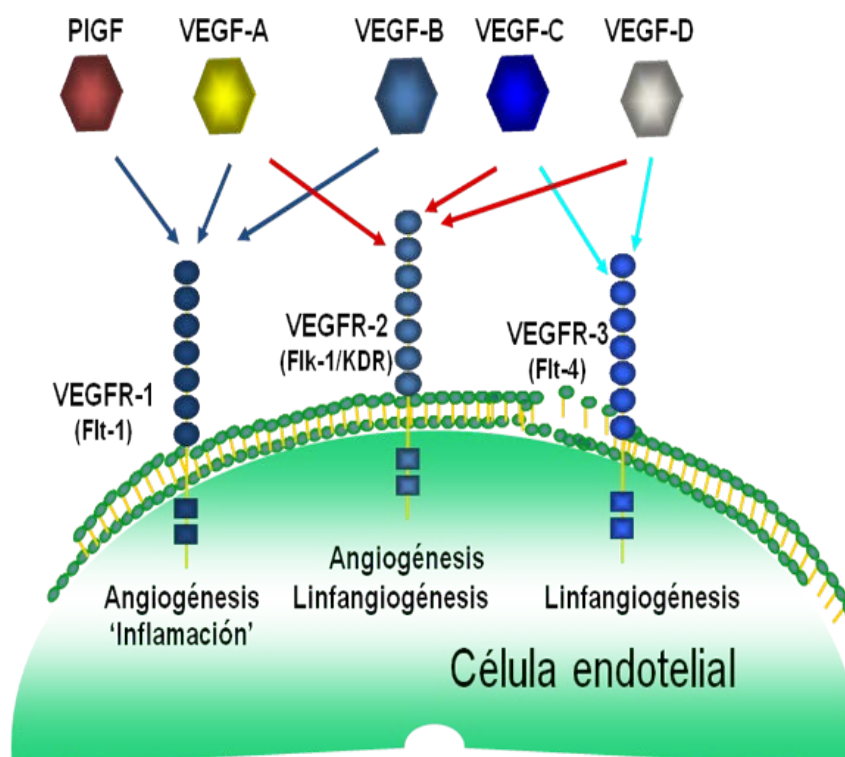
## **2.1 FACTORES DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR Y SUS RECEPTORES**

Tanto la angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos, como la linfangiogénesis, la formación de nuevos vasos linfáticos, son procesos complejos en los que están implicados diferentes mecanismos de señales. El principal sistema que participa en ambos procesos es la familia de proteínas del factor de crecimiento del endotelio vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) y sus receptores asociados. Este sistema se compone de una familia de glicoproteínas que actúan como factores de crecimiento: VEGF-A, -B, -C, -D, y el factor de crecimiento

placentario (*placental growth factor*, PLGF)<sup>39, 40</sup>. Éstos se unen selectivamente, con diferente afinidad, a tres receptores que pertenecen a una superfamilia de receptores tirosina-kinasa transmembrana que se conocen como VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 (Figura 2)<sup>41</sup>. Aunque inicialmente postuló VEGF-A como un factor específico de células endoteliales, estudios más recientes han identificado diversos componentes de esta familia en otros tipos celulares<sup>42-44</sup>. Los factores de VEGF actúan como un mitógeno endotelial potente y selectivo que induce una rápida y completa respuesta angiogénica. El VEGF-A es el factor que se ha estudiado más extensamente y está implicado en la inducción de angiogénesis, mientras VEGF-C y VEGF-D principalmente ejercen su influencia sobre el endotelio linfático<sup>45</sup>.

Figura 2. Sistema VEGF y sus receptores.

Vías de señalización de los diferentes miembros de la familia VEGF, y su acción proliferativa sobre los receptores.



### 2.1.1 Factor de crecimiento del endotelio vascular –A (VEGF-A)

El factor de crecimiento del endotelio vascular-A es una citocina multifuncional secretada por una gran variedad de células, que representa un papel esencial en la vasculogénesis y la angiogénesis<sup>46</sup>. VEGF-A fue descubierto en 1983 como el primer miembro de la familia de VEGF<sup>47</sup>.

Durante su transcripción, se produce una unión alternativa de este factor, dando lugar a múltiples isoformas maduras con diferente longitud de aminoácidos (VEGF-A165, -A121, -A189, -A206), que son capaces de inducir la proliferación y migración de las células endoteliales<sup>48</sup>. Las dos formas que típicamente se producen en las células endoteliales y tumorales son VEGF-A165 y VEGF-A121<sup>26, 49</sup>. Este factor de crecimiento puede unirse a dos receptores tirosina-quinasa, VEGFR-1 y VEGFR-2<sup>48, 50, 51</sup>; cuando el VEGF-A se une a cualquiera de ellos, se inicia una cascada intracelular de señales que da lugar a cambios en la expresión de genes que promueven diferentes acciones. El VEGF-A no es sólo un potente mitógeno del endotelio, sino que también produce un aumento de la permeabilidad capilar (también es conocido como factor de permeabilidad vascular)<sup>52</sup> y estimula a las células endoteliales a que secreten citocinas esenciales para la migración y la formación de nuevos vasos<sup>43</sup>.

La posible contribución de VEGF-A a la linfangiogénesis ha sido tema de debate. Durante mucho tiempo se ha supuesto que el VEGF-A no estaba asociado a ésta; sin embargo, hay estudios experimentales en los que se demuestra que el incremento de expresión de VEGF-A induce la formación de nuevos vasos linfáticos y la dilatación de los pre-existentes<sup>53, 54</sup>. Estudios recientes han puesto de manifiesto el papel de VEGF-A/VEGFR-2 como una vía de señalización en la linfangiogénesis<sup>55</sup>. El papel del VEGF-A es un potente inductor de la proliferación de las células endoteliales linfáticas (LEC) *in vitro*<sup>56</sup>. Sin embargo, se ha demostrado que, aunque el VEGF-A estimula la formación de nueva vasculatura fusionando los capilares sanguíneos en una malla

desorganizada, durante este proceso, sólo se forman unos pocos vasos linfáticos<sup>20, 57</sup>. Los efectos indirectos de VEGF-A, a través de la atracción de células inflamatorias que producen VEGF-C y VEGF-D, pueden también contribuir a su actividad linfangiogénica<sup>58, 59</sup>.

Datos recientes de un estudio, utilizando el ensayo de membrana corioalantoidea de embrión de pollo como modelo experimental *ex vivo*, han mostrado que el VEGF-A y el HGF también podrían influir en la linfangiogénesis sinérgicamente, induciendo una fuerte respuesta angiogénica y expresión de Prox-1 en las células endoteliales linfáticas en esta membrana. Sin embargo, esta observación no ha sido completamente dilucidada *in vivo*<sup>60</sup>.

- **Papel de VEGF-A en la EII**

La citocina angiogénica VEGF-A parece mediar la EII mediante la promoción de la angiogénesis y la inflamación intestinal. El aumento de los niveles de este factor en la EII crónica fue confirmado inicialmente, por estudios en los que se observaron niveles séricos y tisulares significativamente mayores de VEGF-A en pacientes con EC y CU activas que en los controles<sup>16, 55, 61-63</sup>. Aunque posteriormente, otros autores han descrito unos niveles de VEGF-A en plasma más bajos, y una intensidad de inmunotinción más débil, en los pacientes con EC activa que en los controles sanos<sup>64</sup>. En el caso de pacientes con CU, por otro lado, los niveles de VEGF-A en plasma y la intensidad de la inmunotinción fueron similares a los de los controles sanos, lo que ha llevado a sugerir que el curso de la CU pueda ser independiente de VEGF-A.

Curiosamente, Magro et al.<sup>65</sup> obtuvieron en su estudio los mismos resultados para los pacientes con CU, aunque los niveles séricos de VEGF-A en pacientes con EC en remisión, fueron más bajos que los de los controles. Las diferencias en los resultados descritos por estudios anteriores no terminan de aclarar la relación entre la expresión de VEGF-A, y la actividad de la EII.

La principal fuente de aumento de los niveles de VEGF-A en suero durante la EII es controvertida, ya que varios autores han demostrado distintos orígenes posibles de esta citocina. Las células mononucleares de sangre periférica han sido descritas como uno de los orígenes de los elevados niveles séricos de VEGF-A observados en los pacientes con EII. Se ha encontrado un aumento significativo de la producción de VEGF-A por estas células en pacientes con enfermedad activa<sup>66, 67</sup>.

Aunque un estudio inmunohistoquímico de VEGF-A en material quirúrgico de pacientes con EII activa no mostró una expresión marcada de este factor<sup>64</sup>, la mucosa intestinal se ha considerado también como otro posible origen de la elevación los niveles séricos de VEGF-A en pacientes con EII activa<sup>66</sup>. Griga et al. encontraron un aumento de la expresión de VEGF-A en el sobrenadante de cultivos de biopsias de mucosa de pacientes con EII activa en comparación con los de los controles<sup>68</sup>.

Hanabata et al.<sup>69</sup> mostraron que los pacientes con CU con baja sensibilidad a los esteroides presentan una baja expresión de VEGF-A o microvasos ampliados en comparación con los pacientes con una alta sensibilidad a los esteroides y los controles normales. Por lo tanto, la interrupción del proceso de curación o la perturbación de la microcirculación, puede estar involucrada en una baja sensibilidad al tratamiento con esteroides en pacientes con CU.

También se han observado niveles elevados de VEGF-A en pacientes con aumento del flujo sanguíneo intramural<sup>70</sup>. El tejido adiposo, que segrega adipocitocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, fue analizado por Schaffler et al., que concluyó que este tejido representa una fuente importante de la secreción de VEGF-A en pacientes con EC<sup>71</sup>. El HGF y el VEGF-A de las células madre derivadas de tejido adiposo, pueden acelerar la regeneración de las regiones con lesiones durante la colitis experimental en ratas inducida por ácido trinitrobenzeno-sulfónico

(TNBS)<sup>72</sup>. Por último, Beddy et al. detectaron un aumento de la producción de VEGF-A en fibroblastos aislados de estenosis en pacientes con EC<sup>73</sup>.

El VEGF-A también ha sido propuesto como un posible mediador de la inflamación y la permeabilidad de la mucosa en pacientes con colitis colágena. Estos pacientes tienen una mayor secreción de VEGF-A en la mucosa colorrectal, lo que puede conducir a la pérdida de albúmina y promover la fibrosis mediante la deposición de colágeno<sup>74</sup>.

### **2.1.2 Factor de crecimiento del endotelio vascular –C (VEGF-C)**

El factor de crecimiento del endotelio vascular-C (*vascular endothelial growth factor-C*, VEGF-C) se produce en forma de dímero pre-péptido y sufre un proceso de proteólisis en la matriz extracelular para madurar a una forma con una elevada afinidad por su receptor (VEGFR-3). Éste receptor, se encuentra en la superficie de las células endoteliales linfáticas, e induce el proceso de linfangiogénesis. Existe otra forma de este péptido que se puede unir, aunque con menor afinidad, a VEGFR-2 induciendo angiogénesis<sup>75</sup>. La expresión de VEGF-C se produce fundamentalmente en los tejidos adultos como el corazón, músculo, ovario e intestino delgado<sup>76</sup>. Además, se expresa en una gran variedad de tumores en la especie humana como el cáncer de mama, tumores de células escamosas, sarcomas, melanomas, carcinomas pulmonares, etc<sup>76, 77</sup>.

Existen diversos estudios acerca de la implicación de este factor en el proceso linfangiogénico, densidad de vasos linfáticos y la metástasis regional. Aunque los resultados obtenidos por los diferentes grupos investigadores son controvertidos. En un trabajo *in vivo* en ratones xenotransplantados de tumores mamarios, se ha demostrado que VEGF-C se encuentra asociado a un incremento de la densidad de vasos linfáticos y linfangiogénesis intratumoral<sup>78</sup>. Además, estos resultados también han sido observados en otros procesos tumorales en diferentes modelos animales<sup>79-81</sup>.

Los estudios que intentan determinar la relación de VEGF-C con el crecimiento de vasos linfáticos asociados a tumores y la densidad de vasos linfáticos muestran también resultados variados: algunos autores han encontrado influencia del factor VEGF-C en este proceso<sup>43, 82-84</sup>, mientras que otros autores indican que no existe asociación entre VEGF-C y la densidad capilar linfática<sup>85</sup> o que se encuentra más relacionado con el tamaño de los vasos linfáticos que con ésta<sup>86</sup>.

### **2.1.3 Factor de crecimiento del endotelio vascular –D (VEGF-D)**

El factor de crecimiento del endotelio vascular-D (*vascular endothelial growth factor-D*, VEGF-D), es una proteína que tiene un dominio central por donde se une a su receptor y unos extremos terminales NH<sub>2</sub>- y COOH-, que se separan proteolíticamente para dar lugar a la forma madura de la proteína<sup>87</sup>. La forma madura del factor se une a VEGFR-2 y VEGFR-3 con mayor afinidad que la forma inmadura, por lo que el proceso de proteólisis es importante para la activación del factor<sup>87</sup>. El hecho de que se una a estos dos receptores, favorece la hipótesis de que VEGF-D pueda estar implicado en la promoción de la angiogénesis y de la linfangiogénesis<sup>88</sup>; sin embargo, primariamente se une al VEGFR-3<sup>89</sup>, que se expresa fundamentalmente en el endotelio linfático<sup>90</sup>, y de forma secundaria se une al VEGFR-2<sup>91</sup>, presente en el endotelio sanguíneo.

El VEGF-D se expresa en un amplio rango de tejidos normales, siendo muy abundante en corazón, pulmón y músculo esquelético<sup>89, 92</sup>. Además de encontrarse en tejidos sanos, el VEGF-D también se expresa en tejidos neoplásicos, lo que sugiere que VEGF-D tiene una función tanto en situaciones fisiológicas como patológicas<sup>93</sup>. En situaciones fisiológicas, esta citocina podría tener un papel en la remodelación linfática y vascular en procesos como el ciclo menstrual, y en situaciones patológicas podría estar implicado en la progresión tumoral y metástasis<sup>94</sup>.

Por otro lado, se ha descrito que la elevada expresión de VEGF-D promueve los procesos de angiogénesis, linfangiogénesis, tanto en estudios *in vitro*<sup>89</sup>, como *in vivo* en modelos animales<sup>83, 95</sup>. Poco se sabe acerca de la regulación de la expresión de VEGF-D por parte de factores como la hipoxia, factores de crecimiento, citocinas y hormonas.

#### **2.1.4 Factor de crecimiento placentario (PlGF)**

El Factor de crecimiento placentario (*Placental growth factor*, PlGF) es un miembro de la familia del VEGF-A y, se sabe que es prescindible para el desarrollo normal del individuo, sin embargo, presenta diversas funciones en los mecanismos de inflamación tisular durante la isquemia<sup>96</sup>.

El gen del PlGF humano se sitúa en el cromosoma 14q24, y se han descrito cuatro isoformas; PlGF-1–4<sup>97-100</sup>). A diferencia del VEGF-A, que se une tanto al receptor VEGFR-1 como al VEGFR-2, el PlGF se une únicamente al primero<sup>101</sup>. PlGF-1 y -3 son isoformas difusas, mientras que PlGF-2 y -4 tienen dominios de unión a heparina<sup>100</sup>. El PlGF-2 puede unirse también a las neuropilinas NRP-1 y -2<sup>102, 103</sup>.

El PlGF dirige su acción sobre diferentes tipos celulares y regula varias respuestas biológicas. Una de las primeras funciones de PlGF que se detectaron, fueron sus efectos sobre el crecimiento y maduración de los vasos sanguíneos<sup>104-106</sup>. Esta actividad proangiogénica de PlGF se sustenta en un efecto directo sobre las células endoteliales y murales, aumentando su proliferación, migración y supervivencia, así como indirectamente sobre las células no vasculares con actividad proangiogénica<sup>104, 106-109</sup>, aunque algunos de estos efectos continúan siendo tema de debate.

Esta citocina estimula la proliferación de los fibroblastos mesenquimales y regula la respuesta contráctil de las células murales, organizadas alrededor del endotelio



durante el crecimiento de los vasos en el colon<sup>105, 110</sup>. Además, el PIGF recluta progenitores mieloides en los lugares de proliferación, crecimiento y, en general, en los vasos del colon<sup>111-115</sup>. El PIGF también activa y atrae macrófagos, capaces a su vez, de liberar factores angiogénicos y linfangiogénicos<sup>116</sup>, e interfiere en la diferenciación y acumulación de las células dendríticas así como con en el reconocimiento de antígenos<sup>117, 118</sup>.

Inicialmente se postuló que el PIGF estimula el crecimiento de las células endoteliales de manera indirecta desplazando al VEGF-A del receptor VEGFR-1, liberando así VEGF-A suficiente para la activación de VEGFR-2<sup>119</sup>. Sin embargo, la evidencia acumulada sugiere otros mecanismos adicionales. Por ejemplo, el PIGF regula al alza la expresión de otros factores angiogénicos como el VEGF-A, el factor de crecimiento fibroblástico básico (*basic fibroblast growth factor*, FGF2), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*platelet derived growth factor  $\beta$* , PDGFB) y las metaloproteasas de la matriz, junto con otras moléculas<sup>120, 121</sup>. Además, la activación de VEGFR-1 por PIGF induce la aparición de un receptor intermolecular cruzado VEGFR-1: VEGFR-2 que amplifica la señal VEGF-A/VEGFR-2, lo que sugiere que las células endoteliales son capaces de aumentar su propia respuesta a VEGF-A liberando PIGF<sup>122</sup>. Vía activación de VEGFR-1, el PIGF induce diferentes rutas de señalización a las inducidas por VEGF-A como es el caso de los macrófagos, que expresan predominantemente VEGFR-1<sup>123, 124</sup>, pero también de las células endoteliales<sup>122, 125</sup>, que regulan al alza al VEGFR-1 en condiciones patológicas<sup>126-129</sup>. El PIGF induce la fosforilación de residuos de tirosina de VEGFR-1 distintos a los de VEGF-A<sup>122</sup>, lo que refuerza la idea de que el PIGF induce señales angiogénicas diferentes de las de VEGF-A a través de VEGFR-1.

Otros estudios han presentado hallazgos diferentes sobre la actividad biológica del PIGF. Por ejemplo, se ha descrito que este factor no es efectivo en la estimulación del crecimiento y migración de las células endoteliales *in vitro*, lo que se atribuye a una

señal débil de la actividad tirosin-kinasa del VEGFR-1<sup>119</sup>. Sin embargo, las células endoteliales producen abundantes cantidades de PIGF en cultivo, saturando al VEGFR-1 dejándolo sin respuesta al PIGF exógeno. Esta hipótesis se apoya también en los resultados de estudios con ratones *knockout* a PIGF, donde éstos son capaces de responder al PIGF exógeno, pero la pérdida de PIGF reduce la respuesta de las células endoteliales<sup>106, 109</sup>.

Se ha documentado también que el PIGF inhibe la angiogénesis tumoral cuando se expresa a niveles suprafisiológicos en células tumorales que coexpresan VEGF-A. En dichas condiciones, se forman heterodímeros VEGF-A: PIGF a expensas de los homodímeros más proangiogénicos VEGF-A: VEGF-A, lo que explicaría la reducida actividad angiogénica de esas células tumorales<sup>130-132</sup>. Sin embargo, otros estudios indican un efecto proangiogénico de estos heterodímeros, tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>122, 133-135</sup>. Los ratones deficientes en PIGF, exhiben un desarrollo y viabilidad normales<sup>106</sup>. Sin embargo en un modelo de colitis inducida, la deficiencia de PIGF impidió la angiogénesis mucosa, agravó la hipoxia epitelial y empeoró el resultado de la enfermedad. Posteriormente, al implantar el gen de PIGF la curación del colon dañado mejoró de manera notable<sup>136</sup>.

## **2.2 RECEPTORES DE FACTORES DE CRECIMIENTO**

### **2.2.1 Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular -1 (VEGFR-1)**

El receptor 1 del factor de crecimiento del endotelio vascular (*vascular endothelial growth factor receptor-1*, VEGFR-1 o Flt-1) se expresa, casi exclusivamente, de forma fisiológica en las células endoteliales, aunque también se ha descrito su expresión en monocitos y células musculares lisas<sup>137</sup>. El VEGFR-1, se ha identificado como un indicador pronóstico independiente y podría considerarse como un instrumento para evaluar la agresividad tumoral y posibles estrategias terapéuticas<sup>138</sup>.

### 2.2.2 Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular -2 (VEGFR-2)

El receptor de los factores de crecimiento del endotelio vascular-2, (*vascular endothelial growth factor receptor-2*, VEGFR-2 o KDR/Flk-1), generalmente se conoce como el que se encuentra más ligado a la respuesta inducida por VEGF-A. Este receptor es el principal iniciador y regulador de la angiogénesis<sup>139, 140</sup>, mientras que VEGFR-1 podría ser un inhibidor de la misma<sup>140</sup>. Se ha observado (mediante inmunohistoquímica y ELISA) que el VEGFR-2 se expresa abundantemente en las células endoteliales y en las células tumorales<sup>138, 141-144</sup>. Además, la vía de señalización de VEGFR-2 se ha encontrado incrementada tanto en muestras de pacientes con EII y como en ratones con colitis inducida por DSS<sup>55</sup>; sin embargo, Pousa et al. no encontraron diferencias en VEGFR-2 niveles en suero entre pacientes con EII y controles sanos<sup>59, 63</sup>.

### 2.2.3 Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular -3 (VEGFR-3)

El receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular-3 (*vascular endothelial growth factor receptor-3*, VEGFR-3 o Flt-4), fue el primer marcador linfático identificado<sup>90</sup>. Se trata de un receptor tirosina-kinasa de tipo fms, similar en estructura a los otros dos receptores, pero que no se une a VEGF-A<sup>32, 145, 146</sup>, ni a PLGF<sup>147</sup>, ni a VEGF-B<sup>148</sup>. Este receptor se activa específicamente al unirse con VEGF-C y VEGF-D y se ha asociado con el desarrollo y mantenimiento de los vasos linfáticos<sup>76, 89</sup>. Más recientemente se ha descrito que estos factores promueven la linfangiogénesis tumoral y la metástasis linfática, las cuales son inhibidas por el bloqueo de la vía de señalización de VEGFR-3<sup>149</sup>.

VEGFR-3 se expresa inicialmente en todos los endotelios durante el desarrollo embrionógico, tanto en la vasculatura sanguínea como en la linfática, pero en los tejidos adultos normales está restringido a las células endoteliales linfáticas, siendo considerado el mayor regulador de linfangiogénesis en los tejidos normales<sup>90, 150</sup>. Sin

embargo, a pesar de que el VEGFR-3 se expresa predominantemente en el endotelio linfático de tejidos adultos, más recientemente, se ha demostrado que también puede ser expresado en vasos sanguíneos tumorales durante la angiogénesis y, por tanto, no puede considerarse completamente específico de vasos linfáticos<sup>151-153</sup>. Incluso se ha descrito que VEGFR-3 estimula tanto la linfangiogénesis como la angiogénesis<sup>88, 154</sup>. La expresión de VEGFR-3 se ha detectado en algunos capilares sanguíneos asociados con la neovascularización tumoral o con tejido granular<sup>151, 155</sup>.

Los mecanismos moleculares de inflamación inducida por linfangiogénesis siguen siendo en gran parte desconocidos. Ran et al.<sup>156</sup> sugirieron que la inducción de la vía de NF-κB por estímulos inflamatorios activa al gen Prox1. Este factor de transcripción se considera el marcador de linaje más específico del endotelio linfático. Tanto NF-κB como Prox1 activan el promotor de VEGFR-3, lo que lleva a un aumento de la expresión del receptor en las células endoteliales linfáticas en algunos tipos de cáncer, como el de mama<sup>157</sup>. Esto a su vez, mejora la capacidad de respuesta de endotelio preexistente linfático a los factores de unión a VEGFR-3, VEGF-C y VEGF-D, lo que en última instancia, resulta en una linfangiogénesis robusta<sup>158</sup>. La linfangiogénesis y el aumento de la expresión de VEGF-C se han observado en el cáncer de mama, de tiroides y gástrico<sup>159, 160</sup>.

Lohela et al. demostraron que los vasos sanguíneos pueden presentar también una angiogénesis inducida por VEGF-C, incluso después de regulación a la baja de VEGFR-3 en embriones de ratón; sin embargo, la expresión transitoria de VEGF-C en adultos puede inducir hiperplasia linfática de larga duración sin efectos secundarios evidentes en la vasculatura sanguínea<sup>161</sup>. Además, el VEGF-C es un mediador crítico, no sólo para la linfangiogénesis, sino también para la estabilización capilar durante la neovascularización en ratones<sup>162</sup>.

Se ha demostrado que la enzima óxido nítrico sintasa media la linfangiogénesis inducida por VEGF-C en algunos tumores humanos y, en consecuencia, juega un papel crítico en la metástasis linfática. La estimulación de VEGFR-2 y VEGFR-3 activa la óxido nítrico sintasa en las células endoteliales linfáticas, lo que induce su proliferación y/o supervivencia en cultivos de manera dosis dependiente<sup>163</sup>.

- **Función del VEGFR-3 en la EII**

El papel de VEGFR-3 en la aparición de la EII no ha sido analizado en profundidad, aunque se han realizado varios estudios sobre su existencia en el tejido del colon. White et al.<sup>93</sup> evaluaron la expresión de VEGF-D y VEGFR-3 en relación con la densidad de microvasos en los carcinomas y adenomas colorrectales y en el tejido normal adyacente mediante inmunohistoquímica. VEGF-D se detectó en el epitelio maligno y benigno y en diversas áreas de músculo liso colorrectal. Se ha demostrado que la expresión de VEGFR-3 es un indicador pronóstico independiente en carcinomas colorrectales<sup>93</sup>. La inhibición de la linfangiogénesis y el drenaje linfático a través de VEGFR-3 incrementó la gravedad de la inflamación en un modelo de ratón de artritis inflamatoria crónica, una enfermedad autoinmune similar a la EII<sup>164</sup>.

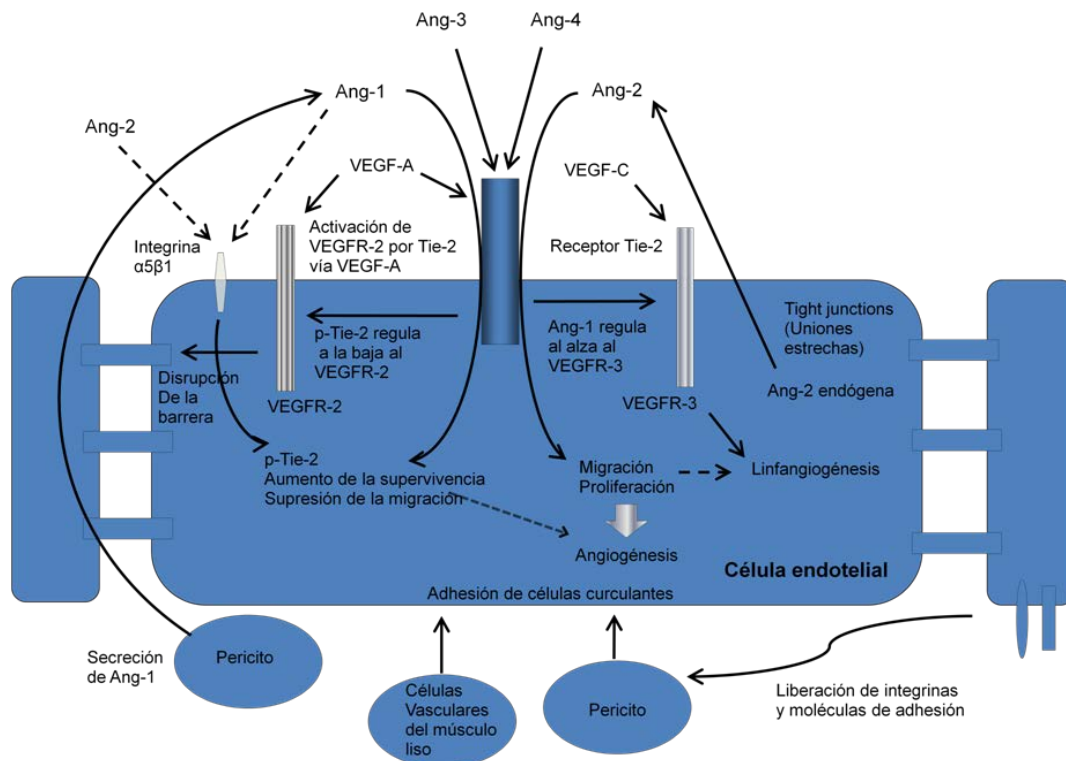
### **2.3 ANGIOPOYETINAS**

Las angiopoyetinas Ang-1, Ang-2 y sus ortólogos entre especies tales como Ang-3 (ratón) / Ang-4 (humana) son ligandos naturales del receptor tirosin-quinasa Tie-2, que se expresa principalmente en las células endoteliales circulantes y en células hematopoyéticas tempranas. El otro receptor tirosin-quinasa Tie-1, es un receptor huérfano que también puede actuar como un receptor de angiopoyetinas, posiblemente formando un complejo con Tie-2, pero poco se sabe acerca de su función en la angiogénesis<sup>165-172</sup>. Las angiopoyetinas no pertenecen a la familia de VEGF, pero también son mediadores clave en la angiogénesis. Las cascadas de señalización del receptor de Ang/Tie participan en eventos fundamentales de la

angiogénesis, incluyendo la estabilización y la remodelación vascular, así como en el reclutamiento de los pericitos y células vasculares del músculo liso (figura 3)<sup>173</sup>. La Ang-1 actúa como un regulador de la maduración de los vasos sanguíneos y tiene propiedades anti-inflamatorias. La estimulación de células endoteliales linfáticas con Ang-1, promueve la regulación del receptor VEGFR-3, lo que sugiere que también se encuentra implicado indirectamente en la vía VEGF-C/VEGFR-3. La Ang-2, en cambio, es particularmente responsable de la iniciación de la angiogénesis y es necesaria para la formación normal de la vasculatura linfática<sup>168, 171, 174-178</sup>.

**Figura 3. Representación esquemática de la posible vía de señalización de Ang/Tie-2 entre las células endoteliales, musculares lisas y pericitos.**

Los multímeros Ang-1 se unen a Tie-2 en las células endoteliales, induciendo la fosforilación del receptor y comportándose como una citocina anti-inflamatoria. El Tie-2 fosforilado también regula a la baja la expresión de VEGFR-2. Cuando Ang-1 se une a Tie-2 sin fosforilación, el VEGFR-3 es regulado hasta inducir la linfangiogénesis. Por contra, la Ang-2 funciona normalmente como un antagonista de Ang-1 y media el aumento en la permeabilidad vascular, y prepara la vasculatura preexistente para la angiogénesis, pero también podría actuar como un agonista parcial de Tie-2 bajo ciertas condiciones: sin inducir la fosforilación, Ang-2 interrumpe la señalización Ang-1/Tie-2. En ausencia de Ang-1, la Ang-2 muestra una actividad agonista de una manera dependiente de la dosis, y esta Ang-2 endógena mantiene la activación de Tie-2. Tanto Ang-1 como Ang-2 se pueden unir a la integrina  $\alpha 5 \beta 1$  integrina de manera parecida que al Tie-2. Ang-3 y Ang-4 se unen a Tie-2 como agonista y antagonista, respectivamente, pero su función exacta no está clara.



### 2.3.1 Angiopoyetina-1

La primera angiopoyetina que se descubrió fue Ang-1, que es secretada por los pericitos, el mesénquima y las células vasculares del músculo liso de la vasculatura en desarrollo, y se cree que estabiliza los vasos sanguíneos recién formados<sup>168, 179</sup>.

La Ang-1 promueve la estabilidad celular de las células endoteliales mediante la inducción de la fosforilación de Tie-2 (p-Tie-2) y la supresión de la migración endotelial, lo que mejora su supervivencia<sup>168, 180-186</sup>. Esto conduce a la inducción y mantenimiento de un fenotipo "de reposo" en los capilares. La Ang-1 también protege contra la inflamación de las vías respiratorias y la hiperreactividad en el asma<sup>187, 188</sup>, reduce la producción de trombina inducida por interleucina-8, la adherencia de neutrófilos<sup>189</sup> y, en general, disminuye la regulación de moléculas de adhesión inflamatorias inducidas por VEGF-A<sup>189</sup>. También impide la hiperpermeabilidad endotelial, manteniendo así la integridad de los vasos, e inhibe las interacciones leucocito-endotelio<sup>170, 174</sup>. Se cree que la Ang-1 y el VEGF-A tienen un efecto complementario en el crecimiento de los vasos sanguíneos que podría deberse a que de alguna manera ambos ligandos son capaces de activar el receptor Tie-2.

La liberación de la proteína Ang-1, a partir de neutrófilos, difiere de la secreción de VEGF-A, debido a que Ang-1 es citosólica y su liberación no es dependiente de calcio, ni del factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  ni de ninguna otra citocina activadora de neutrófilos<sup>190</sup>. La Ang-1 se expresa en la próstata, músculo esquelético, intestino delgado, corazón, y en áreas del cerebro<sup>169</sup>. La interrupción focalizada de Tie-2 o Ang-1 resulta en una letalidad embrionaria, que se produce en una etapa ligeramente posterior a la observada en los animales *knockout* a VEGF-A<sup>191</sup>. Sin embargo, en la vasculatura postnatal, La Ang-1 parece desempeñar un papel predominante en el mantenimiento de la homeostasis endotelial y en la prevención de la inflamación vascular a través de la activación de Tie-2<sup>192</sup>.

Se ha demostrado también, que Ang-1 y Ang-2 interaccionan con otros receptores, incluyendo las integrinas<sup>193</sup>. Se ha observado que la variante monomérica truncada deltaAng-1 se une a la integrina  $\alpha 5\beta 1$  con una afinidad similar en comparación a la del Tie-2. Esto sugiere que las angiopoyetinas podrían estar involucradas en la mediación de la adhesión celular o en la migración a través de las integrinas independientes del receptor Tie-2<sup>194</sup>. Además, en las muestras de colon de pacientes con EC y CU, las células mononucleares B CD19+ de la lámina propia intestinal expresan más integrina  $\alpha 5$  que los especímenes normales<sup>195</sup>.

### **2.3.2 Angiopoyetina-2**

Otro factor importante implicado en la angiogénesis, y descubierto por homología de secuencia con Ang-1, es la Ang-2<sup>169</sup>. El papel funcional de Ang-2 es el de actuar como un antagonista competitivo de Ang-1 en células endoteliales y vasculares del músculo liso. Regula a la baja la señalización de Tie-2, liberando así el endotelio vascular de la fuerte influencia inhibidora de Ang-1<sup>196</sup>.

La Ang-2 facilita la activación de las células endoteliales en respuesta a VEGF-A y a otros factores de crecimiento clásicos, y a una condición fisiopatológica dada, como la hipoxia<sup>197</sup>. Promueve la angiogénesis permitiendo que las células endoteliales sean más sensibles a la proliferación celular mediada por VEGF-A, la cual es necesaria para la reparación y regeneración de las éstas<sup>182, 183, 198</sup>. En ausencia de VEGF-A, la Ang-2 desestabiliza la interacción entre las células endoteliales y sus células de apoyo, causando la pérdida de plasma y promoviendo la regresión vascular<sup>169, 199-203</sup>.

Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la actividad de la Ang-2 es más compleja de lo que se creía anteriormente. Cuando se une a Tie-2 sin inducir la fosforilación, la Ang-2 interrumpe la señalización Ang-1/Tie-2, actuando principalmente como un antagonista funcional de Ang-1 de una manera autocrina<sup>165, 166, 169, 186, 204, 205</sup>.



Tales efectos beneficiosos o perjudiciales sobre la inflamación no sólo dependen de la fosforilación del receptor Tie-2, sino también de la duración de su unión al receptor particular<sup>182, 185, 196, 206, 207</sup>.

La Ang-2 muestra una actividad agonista vinculante a Tie-2 en ausencia de Ang-1; sin embargo, funciona como un antagonista dependiente de la dosis cuando la Ang-1 está presente. Las células endoteliales producen Ang-2, pero no Ang-1, y esta Ang-2 endógena mantiene su supervivencia, migración y formación tubular. Cuando estas células son estimuladas con Ang-1 y Ang-2, la Ang-2 inhibe de manera dosis-dependiente su supervivencia inducida por Ang-1. Aunque la Ang-2 es un agonista más débil que Ang-1, de manera endógena mantiene un nivel de activación de Tie-2 que es crítico para el espectro de funciones de las células endoteliales<sup>208, 209</sup>. Esta modulación de la actividad dependiente de la dosis de Ang-2, puede ser importante en la regulación de la formación de neovasos puesto que un ligando puede mediar tanto en la inhibición inicial de Tie-2 (actividad necesaria para una respuesta angiogénica temprana eficiente), como en la maduración posterior y estabilización de la neovascularización<sup>171</sup>.

La Ang-2 activa múltiples vías de señalización como la generación de oxígeno reactivo, y también juega un papel mediador en la sensibilización de las células endoteliales al TNF- $\alpha$ , pudiendo así exagerar las respuestas inflamatorias<sup>196, 210</sup>. En los tejidos humanos adultos, la expresión de Ang-2 se restringe en gran medida a sitios de remodelación vascular activa tales como ovarios, útero y la placenta, mientras que la Ang-1 se encuentra más extendida<sup>169</sup>.

### **2.3.3 Papel de angiopoyetinas en la EII**

Koutroubakis et al. fueron los primeros en medir los niveles séricos circulantes de Ang-2 y Tie-2 en pacientes con EII<sup>211</sup>. Ambos factores angiogénicos se encontraron ligeramente elevados en pacientes con EC y CU en comparación con los controles y la

Ang-2 también se correlacionó con la actividad de la enfermedad. En los pacientes con EII activa, se encontraron niveles significativamente más altos de Ang-2 en comparación con los pacientes con enfermedad inactiva. Tanto los niveles séricos medios de Ang-2 como de Tie-2 fueron significativamente mayores y menores, respectivamente, en los pacientes con enfermedad temprana (diagnóstico <2 años) en comparación con los pacientes con EII con diagnóstico tardío de la enfermedad<sup>211</sup>. Un segundo estudio, donde los niveles de Ang-1 también se evaluaron, en contraste con los de Ang-2 y Tie-2, fueron menores en los pacientes con EC en comparación con los controles sanos. Este desequilibrio entre Ang-1 y Ang-2 puede reflejar un proceso anormal de maduración y estabilización de la red vascular durante el curso de la EII. También se encontraron varias correlaciones entre las angiopoyetinas y los reactivos de fase aguda<sup>59</sup>.

En un trabajo posterior, también se sugirió que, además de la posible función de los niveles de angiopoyetinas como marcadores circulantes de la enfermedad, la vía Ang/Tie puede desempeñar un papel en la progresión local de la CU<sup>212</sup>. Mediante el estudio de muestras de tejido de la mucosa cólica, los autores encontraron que el epitelio de los abscesos crípticos fue fuertemente positivo para Ang-1 y Ang-2 en muestras procedentes de pacientes con CU activa, aunque el epitelio colorrectal sin abscesos crípticos mostró mínima expresión de Ang-1, Ang-2, y Tie-2. Las muestras de los pacientes con CU en remisión mostraron significativamente menos inmunoreactividad para Ang-1, Ang-2, o Tie-2. Por lo tanto, confirmaron que la respuesta angiogénica es inducida por Ang-2, en presencia de VEGF-A, bloqueando el efecto de estabilización de vasos de Ang-1<sup>212</sup>.

Estos resultados concuerdan con los de un gran estudio realizado en pacientes con EII en el que los pacientes con EC restringida al colon tuvieron niveles en suero significativamente más bajos en comparación con otros fenotipos, probablemente debido a una variabilidad transitoria o heterogeneidad de características de las células

endoteliales Ang-2<sup>213</sup>. Además, los autores encontraron mayores niveles de Ang-1 en suero de pacientes con CU que eran fumadores en comparación con los no fumadores. Este aumento de Ang-1 en pacientes fumadores con CU, pero no en los de EC, puede estar relacionado con el efecto de la nicotina sobre la angiogénesis, que se sabe que regula al alza al VEGF-A<sup>214, 215</sup>. Esto probablemente sugiere una colaboración entre el VEGF-A y el sistema de angiopoyetinas en la CU, cosa que puede no ocurrir en la EC<sup>59</sup>. Por otra parte, se estableció que los niveles de Ang-1 y Ang-2 se encuentran relacionados con la duración o la actividad de la enfermedad. Datos que contrastan con los datos anteriores encontrados en suero para la Ang-2<sup>213, 216</sup>.

Recientemente, Pousa et al. evaluaron los niveles séricos de angiopoyetina en pacientes con CU que se sometieron a tratamiento con corticoides orales. Al inicio del estudio, los niveles de Ang-1 fueron inferiores a los de los individuos sanos, mientras que los de Ang-2, junto con los de VEGF-A, fueron más altos que en los controles. En el mismo trabajo, se encontró una correlación entre los niveles de angiopoyetinas y la actividad clínica en los pacientes con CU<sup>217</sup>. Después del tratamiento, los pacientes que alcanzaron la remisión completa, mostraron unos niveles séricos de Ang-1 y Ang-2, pero no de Tie-2 más elevados, en comparación con aquellos que no lograron remisión. Además, después de completar el tratamiento, las concentraciones de Ang-1 y Ang-2 casi volvieron a sus niveles basales<sup>217</sup>. Por lo tanto, los corticosteroides parecen alterar temporalmente los niveles de VEGF y angiopoyetinas circulantes en la EII.

#### **2.3.4 Otros factores de crecimiento linfangiogénico en la EII**

Varias familias de factores de crecimiento pueden desempeñar un papel importante en la EII, incluyendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (b-FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Colectivamente, estas

familias podrían determinar la susceptibilidad de la lesión mucosa en la EII y/o facilitar la reparación de tejidos. Sin embargo, pocos estudios comparativos han evaluado el papel de estos marcadores en la linfangiogénesis en los pacientes con EII<sup>218</sup>.

### **III. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

---

Hasta la fecha, existen pocos estudios que hayan investigado la distribución y densidad de los vasos linfáticos y sanguíneos en relación con la EII. Se sabe que el incremento de la densidad de la microvasculatura es una característica constante en esta enfermedad, y que aparece incluso en las zonas donde no existe inflamación. Al comparar entre EC y CU, algunos autores han observado que el número medio de vasos linfáticos en la EC es considerablemente más alto que en la CU y otros procesos inflamatorios<sup>18</sup>, mientras que otros investigadores evidencian resultados opuestos o no encuentran diferencias significativas<sup>219-221</sup>.

Una caracterización completa de los procesos angiogénico y linfangiogénico contribuirá a dilucidar la patogénesis de la EII y generará líneas de investigación futura en este campo.

## **1. HIPÓTESIS PRINCIPAL**

La localización y el marcaje de la expresión de los factores angiogénicos y linfangiogénicos y de sus receptores en la mucosa intestinal se correlacionan con la actividad de la EII, y podría considerarse como un instrumento para evaluar el grado de desarrollo microvacular y posibles estrategias terapéuticas.

## **2. OBJETIVOS**

1. Determinar la expresión y localización de los principales factores angiogénicos y linfangiogénicos (VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, PlGF, Ang-1, Ang-2) y de sus receptores (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 y Tie-2) en muestras de tejido cólico de pacientes con EII activa e inactiva (quiescente) y en un grupo de pacientes sin EII.

- 1.1. Determinar si existen diferencias entre pacientes con y sin EII.

- 1.2. Estudiar si existen diferencias entre pacientes con EC y CU.
- 1.3. Evaluar las variaciones entre pacientes con EC o CU activa y en remisión, y entre tejido afecto y no afecto.
2. Correlacionar la expresión de los factores angiogénicos y linfangiogénicos estudiados con el grado de desarrollo de la microvasculatura cólica.

## **IV. PACIENTES Y MÉTODOS**

---



## **1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

### **1.1 PACIENTES Y CONTROLES**

Estudio prospectivo en el que se incluyeron pacientes que se sometieron a una colonoscopia por criterios médicos en los hospitales de La Princesa y de Fuenlabrada.

Se consideraron controles los pacientes sin EII que, a criterio médico, debieron someterse a este procedimiento para despistaje de diversas enfermedades. En los casos de diarrea con colonoscopia normal en los que debiera descartarse una colitis microscópica, se aprovechó la toma de muestra para el estudio anatomopatológico. Los controles fueron pareados por edad y sexo con los pacientes con EII, y la inclusión de pacientes se realizó de forma consecutiva, descartándose aquellos que finalmente tuvieron una colitis microscópica.

El diagnóstico de la EII se llevó a cabo mediante hallazgos clínicos, radiológicos, endoscópicos e histológicos<sup>1</sup>. La localización de la EII se estableció conforme a la clasificación de Montreal<sup>222</sup>. Todos los pacientes firmaron un formulario de consentimiento informado antes de la inclusión. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de los centros participantes conforme con los criterios establecidos en la Declaración de Helsinki.

La EII se clasificó en activa e inactiva por criterios endoscópicos, como se define más adelante en el texto.

### **1.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS**

La obtención de las biopsias de la mucosa intestinal de los pacientes incluidos en alguno de los grupos muestrales fue distinta en función del tipo y la localización de la EII y se realizó como se detalla a continuación:

1. Pacientes con CU activa: se tomaron muestras de zona afectada y muestras de zona no afectada si la localización de la enfermedad así lo permitió. Si no fue así, se tomó muestra solamente de la zona afectada.

2. Pacientes con CU quiescentes o EC cólica inactiva o pacientes sanos: se tomaron 1-2 muestras del colon proximal pasada la unión rectosigmoidea (sobre 25 cm).

3. Pacientes con EC cólica activa sometidos a rectoscopia/colonoscopia: debido a la distribución discontinua de la enfermedad, se tomaron 1-2 muestras de zona con inflamación. La toma de muestras se realizó de la misma forma que para la CU activa en el caso de haber encontrado alguna zona sana.

### **1.3 PROCESADO DE MUESTRAS PARA HISTOPATOLOGÍA**

Todas las muestras obtenidas de las biopsias de los pacientes incluidos en el estudio se han analizado en el Servicio de Anatomía Patológica de los centros participantes. Las muestras fueron procesadas siguiendo la metodología rutinaria del laboratorio de diagnóstico anatomopatológico. Dichas muestras permanecieron en formol tamponado comercial al 10% durante un mínimo de 24 horas a temperatura ambiente para su fijación. Cada pieza se colocó en un casete y se incluyó en parafina sintética mediante el uso de un procesador automático de tejidos. En ese proceso, los casetes se pasan automáticamente por una serie de alcoholes y bencenos para la eliminación del formol, deshidratación y la posterior inclusión en parafina sintética a 56-57°C. A continuación, se realizaron los bloques de tejidos en parafina utilizando una unidad formadora.

A partir de los bloques se obtuvieron secciones de tejido en parafina de 4 µm de grosor mediante un microtomo de rotación. Para su tinción con hematoxilina y eosina (H-E) y otras técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas posteriores, las secciones

se desparafinaron en xilol y siguieron un proceso de hidratación pasando por una serie de alcoholes de gradación decreciente hasta el agua. La deshidratación tras la tinción se realizó de forma inversa, pasando por una serie de alcoholes de grado creciente y xilol. Las preparaciones se montaron con un medio 03989 Fluka Eukitt® y cubreobjetos. Por último, se realizó un estudio histopatológico valorando todas las muestras de cada sujeto.

## 2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA EII

### 2.1 ACTIVIDAD ENDOSCÓPICA DE LA EII

La actividad endoscópica de los pacientes con EC y CU (tabla 1) se evaluó y clasificó por los gastroenterólogos experimentados que realizaron los colonoscopias y calificaron los resultados de acuerdo con el índice simple endoscópico simple para EC (*Simple Endoscopic Score index* en inglés) (SES-CD)<sup>223</sup> y el subíndice endoscópico de Mayo (*endoscopic Mayo subscore*) para la CU<sup>224</sup>. En pacientes con EC, la actividad se valoró tanto en el colon como en el íleon terminal.

Tabla 1. Actividad endoscópica de la EII

	Inactiva	Leve	Moderada	Grave
Índice SES-CD	0-2	3-6	7-15	≥16
Índice Mayo endoscópico	0	1	2	3

Una puntuación de SES-CD entre 0 y 2 sugiere enfermedad inactiva en el colon y el íleon terminal, 3-6 medianamente activa, 7-15 moderadamente activa, y ≥16 gravemente activa. En cuanto a la actividad de la CU, una subpuntuación endoscópica de Mayo de 0 se considera enfermedad inactiva, 1 como actividad leve, 2 como actividad moderada y 3 actividad grave (Tabla 2).

Tabla 2. Subíndice endoscópico de Mayo para CU

Aspecto de la mucosa	0. Normal	1. Afectación leve	2. Afectación moderada	3. Afectación intensa
Resultados endoscópicos	Patrón vascular intacto sin friabilidad ni granulación	Eritema, reducción del patrón vascular o granulación mínima	Eritema pronunciado, granulación, friabilidad, patrón vascular ausente, hemorragia con traumatismo mínimo, ausencia de úlceras	Úlceras, hemorragia espontánea

Tabla 3. Índice de SES-CD para la enfermedad de Crohn

	Íleon	Colon derecho	Colon transversal	Colon izquierdo	Recto	Ano
Presencia y tamaño de úlceras (0-3)						
Extensión de la superficie ulcerada (0-3)						
Extensión de la superficie afectada (0-3)						
Presencia y tipo de estenosis						
Puntuación total SES-CD						

*Interpretación de la puntuación total del SES-CD:*

Curación de la mucosa 0-2 puntos

Afectación leve 3-6 puntos

Afectación moderada 7-15 puntos

Afectación grave  $\geq 16$  puntos

Tabla 4. Clasificación Índice SES-CD

	0	1	2	3
Tamaño de las úlceras	No	Aftas (diámetro 0,1- 0,5 cm)	Úlceras grandes (diámetro 0,5-2 cm)	Úlceras muy grandes (diámetro > 2 cm)
Superficie ulcerada	No	<10%	10-30%	>30%
Superficie afectada	Segmento sin afectación	<50%	50-75%	>75%
Estenosis	No	Simple, permite el paso	Múltiples, permite el paso	No permite el paso

## **2.2 ACTIVIDAD HISTOLÓGICA DE LA EII**

Todas las muestras fueron sometidas a un examen histológico por un patólogo experimentado. La actividad histológica se realizó mediante el examen patológico de las mismas.

En los pacientes con EC, la actividad histológica se clasificó de acuerdo con una escala de alteraciones de la mucosa desarrollado por D'Haens et al (tabla 5)<sup>225</sup>.

**Tabla 5. Clasificación Índice D'Haens para la actividad histológica de la EC**

	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Daño epitelial</b>	Normal	Patología focal	Patología extensa	-
<b>Cambios en la arquitectura</b>	Normal	Moderadamente alterada	Gravemente alterada	-
<b>Infiltración de la lámina propia por células polimorfonucleares o mononucleares</b>	Normal	Aumento leve	Aumento moderado	Aumento grave
<b>Células polimorfonucleares en el epitelio</b>	En epitelio superficial	Criptitis	Absceso en la cripta	Destrucción de la cripta
<b>Presencia de erosión y / o úlcera y presencia de granuloma</b>	No	Sí	-	-
<b>Número de biopsias afectas</b>	Ninguna	<33%	33-66%	>66%

Curación de la mucosa 0 puntos  
 Afectación leve 1-6 puntos  
 Afectación moderada 7-11 puntos  
 Afectación grave  $\geq 12$  puntos

Los hallazgos histológicos en pacientes con CU se evaluaron utilizando el Índice de Riley (tabla 6)<sup>226</sup>.

Tabla 6. Clasificación Índice Riley para la actividad histológica de la CU

	0	1	2	3
<b>Integridad del epitelio superficial</b>	Normal	Patología focal	Patología extensa	-
<b>Irregularidades en la arquitectura de las criptas</b>	Normal	Moderadamente alterada	Gravemente alterada	-
<b>Infiltrado inflamatorio celular agudo (células polimorfonucleares en la lámina propia)</b>	Normal	Aumento leve	Aumento moderado	Aumento grave
<b>Abscesos en las criptas</b>	En epitelio superficial	Criptitis	Absceso en la cripta	Destrucción de la cripta
<b>Disminución de mucina</b>	Ninguna	Parcial	Total	-
<b>Infiltrado celular inflamatorio crónico (células redondas en la lámina propia)</b>	Normal	Aumento leve	Aumento moderado	Aumento grave

Curación de la mucosa 0 puntos

Afectación leve 1-6 puntos

Afectación moderada 7-11 puntos

Afectación grave  $\geq 12$  puntos

#### 4. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Los anticuerpos empleados en este estudio fueron evaluados mediante la técnica inmunohistoquímica de estreptavidina-biotina-peroxidasa. Los anticuerpos utilizados, la casa comercial y el tipo de anticuerpo (monoclonal o policlonal) se resumen en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Anticuerpos empleados

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	TIPO
CD34	QBEnd-10 Dako®	Monoclonal
D2-40	Clone D2-40 Dako®,	Monoclonal
VEGF-A	Clon:1F07-2C01 Biolegend®	Monoclonal
VEGF-C	BV-5633-100 Biovision®	Monoclonal
VEGF-D	BV-3565-100 Biovision®	Monoclonal
VEGFR-1	MAB1664 Merck KGaA©	Monoclonal
VEGFR-2	MAB1667 Merck KGaA©	Monoclonal
VEGFR-3	MAB3757 Merck KGaA©	Monoclonal
PIGF	102-PA01S, RELIATech GmbH	Monoclonal
Ang-1	AF923 RYD Systems Europe Ltd	Policlonal
Ang-2	AF623 RYD Systems Europe Ltd	Policlonal
Tie-2	AF313 RYD Systems Europe Ltd	Policlonal

## 5. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE MARCADORES DE CÉLULAS ENDOTELIALES

En este apartado de la investigación se ha realizado el estudio inmunohistoquímico de diferentes marcadores vasculares para detectar células endoteliales maduras (D2-40) y de precursores de células endoteliales (CD34), presentes en las muestras de los tejidos cólicos de pacientes con EII, (CU, EC y controles). Para ello, se emplearon los anticuerpos y las técnicas inmunohistoquímicas detallados a continuación.

### **5.1 DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE CD34**

Se empleó el anticuerpo monoclonal anti-*human* CD34 *Class II* clon: QBEnd-10, N°: M 7165 (*Dako®*, Glostrup, Denmark). El CD34 es una proteína que se expresa en las células madre/progenitoras hematopoyéticas inmaduras, en las células endoteliales de los capilares sanguíneos, en los fibroblastos embrionarios y en las células gliales atípicas del tejido nervioso<sup>227, 228</sup>.

1. Desparafinar e hidratar: se desparafinó en xilol (10´) y se hidrató mediante pases (de 5´) por una serie de alcoholes de graduación decreciente (100º, 96º, 70º). Se lavaron las preparaciones en agua destilada (5´).
2. Desenmascaramiento antigénico: se sometieron las preparaciones a un calentamiento en olla a presión en 1 l de Tris-EDTA pH 9 (DAKO) durante 2´
3. Lavado I: las preparaciones se lavaron una vez 5´ en agua destilada.
4. Inhibición de la peroxidasa endógena: las preparaciones se sumergieron en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% en metanol durante 10´.
5. Lavado II: se realizaron dos lavados de 5´ cada uno en PBS.

6. Incubación con anticuerpo primario: se añadió el anticuerpo primario y se incubó durante 60' en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD34 *Class II* (clon: QBEnd-10, N°: M 7165, *Dako®*, Glostrup, Denmark), a una dilución 1/100.
7. Lavado III: se realizaron igual que el lavado II.
8. Incubación con anticuerpo secundario: se añadió el kit *Dako REAL™ EnVision™ Detection System*, Product No. K400711 (frasco A) sobre cada preparación y se incubaron durante 30' a temperatura de ambiente.
9. Lavado IV: se realizó igual que el lavado II.
10. Revelado: a las preparaciones se les añadió una solución cromógena de *Substrate Working Solution*, que contenía DAB (CHROM), que se preparó mezclando 20 µL de *Dako REAL™ DAB+ Chromogen* (frasco C) y 1 ml de *Dako REAL™ Substrate Buffer* (frasco B).
11. Lavado V: se lavaron las preparaciones con agua corriente durante 5'.
12. Contraste con hematoxilina: las preparaciones se contrastaron sumergiéndolas en hematoxilina de Harris durante 1 minuto.
13. Lavado VI: se lavaron las preparaciones en agua corriente durante 5'.
14. Deshidratación y montaje: se deshidrataron las muestras realizando pases rápidos (20 de 30'' cada uno) en una serie de alcoholes de graduación ascendente (70°, 96°, 100°) y se aclararon en xilol 5'. Por último se montaron con el medio 03989 *Fluka Eukitt®* y cubreobjetos.



Como control positivo se incluyó una muestra de tejido perteneciente a una amígdala sana, que presentaba reactividad comprobada frente al anticuerpo primario empleado.

## **5.2 DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA MOLÉCULA D2-40**

El anticuerpo monoclonal D2-40 Monoclonal Mouse Anti-Human Podoplanin Clone D2-40

Nº de catálogo M3619 (*Dako®*, Glostrup, Denmark), es un marcador de células endoteliales linfáticas humanas. Este anticuerpo es muy sensible y específico en la detección de vasos linfáticos en muchos tejidos humanos<sup>229</sup>.

1. Desparafinar e hidratar: se desparafinó en xilol (10´) y se hidrató mediante pases (de 5-10´) por una serie de alcoholes decrecientes (100º, 96º, 70º). Se lavaron las preparaciones en agua destilada (5´).
2. Desenmascaramiento antigénico por calor: se sometieron las preparaciones a un tratamiento con calor en una olla a presión, con 1 l de tampón citrato (10mM, pH=6,0). Cuando se alcanzó la presión máxima, se bajó la temperatura del fuego y las preparaciones permanecieron durante 2 minutos en la olla antes de abrir. Se dejaron enfriar en el citrato durante 30´ a temperatura ambiente.
3. Lavado I: las preparaciones se lavaron 5´ en agua destilada.
4. Inhibición de la peroxidasa endógena: las preparaciones se sumergieron en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% en metanol durante 15´.
5. Lavado II: se realizaron dos lavados de 5´ cada uno en PBS.

**6.** Incubación con anticuerpo primario: se añadió el anticuerpo primario y se incubó durante 60' en una cámara húmeda. Se empleó el anticuerpo monoclonal de ratón D2-40

Nº de catálogo M3619 (Dako®, Glostrup, Denmark) a una dilución 1/400.

**7.** Lavado III: se realizó igual que el lavado II.

**8.** Incubación con anticuerpo secundario: se añadió el kit Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Product No. K400711 (frasco A) sobre cada preparación y se incubó durante 30' a temperatura de ambiente.

**9.** Lavado IV: se realizó igual que el lavado II.

**10.** Revelado: a las preparaciones se les añade una solución cromógena de Substrate Working Solution, que contiene DAB (CHROM), que se preparó mezclando 20 µL de Dako REAL™ DAB+ Chromogen (frasco C) y 1 ml de Dako REAL™ Substrate Buffer (frasco B).

**11.** Lavado V: se lavaron las preparaciones con agua corriente durante 5'.

**12.** Contraste con hematoxilina: las preparaciones se contrastaron sumergiéndolas en hematoxilina de Harris durante 1 minuto.

**13.** Lavado VI: se lavaron las preparaciones en agua corriente durante 5'.

**14.** Deshidratación y montaje: se deshidrataron las muestras realizando pases rápidos (20 de 30'' cada uno) en una serie de alcoholes de graduación ascendente (70º, 96º, 100º) y se aclararon en xilol 5'. Por último se montaron con el medio 03989 Fluka Eukitt® y cubreobjetos.

Como control positivo se incluyó una muestra de tejido perteneciente a una amígdala sana, que presentaba reactividad comprobada frente al anticuerpo primario

empleado, que presentaba abundantes vasos linfáticos a la observación de la H-E. Además, en cada una de las preparaciones se realizó un control interno mediante la observación de la tinción de células endoteliales linfáticas.

## **6. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS Y LINFANGIOGÉNICOS**

### **6.1 DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE ANG-1, ANG-2 Y TIE-2**

Se utilizaron los anticuerpos policlonales anti-cabra de RYD Systems Europe Ltd, Reino Unido; Ang-1 (Nº de catálogo AF923), Ang-2 (Nº de catálogo AF623) y Tie-2 (Nº de catálogo AF313).

1. Desparafinado e hidratación: las muestras se desparafinaron en xilol (10´) y se hidrataron mediante pases (de 5-10´) por una serie de alcoholes decrecientes (100º, 96º, 70º). Posteriormente se lavaron en agua destilada (5´).
2. Desenmascaramiento antigénico por calor: se sometieron las preparaciones a un tratamiento con calor en una olla a presión, con 1 l de tampón Tris-EDTA (10mM, pH=9,0). Cuando se alcanzó la presión máxima, se bajó la temperatura del fuego y las preparaciones permanecieron durante 2 minutos en la olla antes de abrir. Se dejaron enfriar en el citrato durante 30´ a temperatura ambiente.
3. Lavado I: las preparaciones se lavaron 5´ en agua destilada.
4. Inhibición de la peroxidasa endógena: las preparaciones se sumergieron en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,5 ml) en metanol (98,5 ml) durante 15´.
5. Lavado II: se realizaron dos lavados de 5´ cada uno en PBS.
6. Incubación con anticuerpo primario: se añadió el anticuerpo primario y se incubó durante 60´ a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Se

emplearon los anticuerpos policlonales anti-cabra con las siguientes diluciones:  
Ang-1 dilución 1/800, Ang-2 y Tie-2 dilución 1/400.

**7. Lavado III:** se realizaron dos lavados de 5' cada uno en PBS.

**8. Incubación con anticuerpo secundario:** se añadió el anticuerpo secundario anti-cabra IgG conjugado con peroxidasa, N° de Catálogo HAF019 (*Dako®*, Glostrup, Denmark), dilución 1/100 sobre cada preparación y se incubó durante 30' a temperatura de ambiente.

**9. Lavado IV:** se realizó igual que el lavado III.

**10. Revelado:** a las preparaciones se les añadió una solución cromógena de Substrate Working Solution, que contenía DAB (CHROM), que se preparó mezclando 20 µL de Dako REAL™ DAB+ Chromogen (frasco C) y 1 ml de Dako REAL™ Substrate Buffer (frasco B).

**11. Lavado V:** se lavaron las preparaciones con agua corriente durante 5'.

**12. Contraste con hematoxilina:** las preparaciones se contrastaron sumergiéndolas en hematoxilina de Harris durante 1 minuto.

**13. Lavado VI:** se lavaron las preparaciones en agua corriente durante 5'.

**14. Deshidratación y montaje:** se deshidrataron las muestras realizando pases rápidos (20 de 30'' cada uno) en una serie de alcoholes de graduación ascendente (70°, 96°, 100°) y se aclararon en xilol 5'. Por último se montaron con el medio 03989 Fluka Eukitt® y cubreobjetos.

Como control positivo se incluyó una muestra de tejido perteneciente a una amígdala sana, que presentaba reactividad comprobada frente al anticuerpo primario

empleado. La densidad capilar positiva de Ang-1, Ang-2 y Tie-2 se determinó por recuento directo en cuatro campos con un aumento de 40X.

## **6.2 DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, PLGF, VEGFR-1, VEGFR-2 Y VEGFR-3**

Se realizó el estudio inmunohistoquímico de varios factores de crecimiento vascular pertenecientes a la familia de VEGF; VEGF-A (Anti-ratón, N° de Catálogo 512901, Clon:1F07-2C01, Biolegend®), VEGF-C (Anti-conejo, N° de Catálogo BV-5633-100, Biovision®), VEGF-D (Anti-conejo, N° de Catálogo BV-3565-100, Biovision®), PIGF (Anti-conejo, N° de Catálogo 102-PA01S, RELIA Tech GmbH), VEGFR-1 (Anti-ratón, N° de Catálogo MAB1664, Merck Millipore, Merck KGaA®, Darmstadt, Alemania), VEGFR-2 (Anti-conejo, N° de Catálogo MAB1667, Merck Millipore, Merck KGaA®, Darmstadt, Alemania), y VEGFR-3 (Anti-conejo, N° de Catálogo MAB3757, Merck Millipore, Merck KGaA®, Darmstadt, Alemania), en las muestras de tejido de los pacientes con EC, CU y controles para caracterizar la expresión de dichos factores y receptores en las células epiteliales de dichas muestras.

A continuación se describen los pasos empleados:

1. Desparafinación e hidratación: se desparafinó en xilol (10´) y se hidrató mediante pases (de 5-10´) por una serie de alcoholes decrecientes (100°, 96°, 70°). Se lavaron las preparaciones en agua destilada (5´).
2. Desenmascaramiento antigénico por calor: se sometieron las preparaciones a un tratamiento con calor en una olla a presión, con 1 l de tampón citrato (100mM, pH=6,0) en el caso de VEGF-C, VEGF-D, PIGF, VEGFR-2 y VEGFR-3, y con 1 l de tampón EDTA (ácido etilendiaminotetracético) (1mM, pH=9,0) en el caso de VEGF-A y VEGFR-1. Cuando se alcanzó la presión máxima, se bajó

la temperatura del fuego y las preparaciones permanecieron durante 2 minutos en la olla antes de abrir. Se dejaron enfriar en el medio tamponado durante 30' a temperatura ambiente.

3. Lavado I: las preparaciones se lavaron 5' en agua destilada.

4. Inhibición de la peroxidasa endógena: las preparaciones se sumergieron en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% en metanol durante 15'.

5. Lavado II: se realizaron dos lavados de 5' cada uno en PBS.

6. Bloqueo de uniones inespecíficas: se añadió sobre cada preparación un ultrabloqueante (*Master Diagnóstica*®, prediluido listo para uso) y se incubó a temperatura de ambiente durante 10'.

7. Lavado III: se realizaron dos lavados de 5' cada uno en PBS.

8. Incubación con anticuerpo primario: se añadió el anticuerpo primario y se incubó durante 60' en una cámara húmeda. Se emplearon los anticuerpos arriba mencionados a las siguientes diluciones: anti-VEGF-A 1/100, PIGF 1/200, VEGF-C 1/150, VEGF-D 1/300, VEGFR-1 1/200, VEGFR-2 1/50 y VEGFR-3 1/100.

8. Incubación con anticuerpo secundario: se añadió el kit Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Product No. K400711 (frasco A) sobre cada preparación y se incubó durante 30' a temperatura de ambiente.

9. Lavado IV: se realizó igual que el lavado II.

10. Revelado: a las preparaciones se les añadió una solución cromógena de Substrate Working Solution, que contenía DAB (CHROM), que se preparó

mezclando 20 µL de Dako REAL™ DAB+ Chromogen (frasco C) y 1 ml de Dako REAL™ Substrate Buffer (frasco B).

**11.** Lavado V: se lavaron las preparaciones con agua corriente durante 5´.

**12.** Contraste con hematoxilina: las preparaciones se contrastaron sumergiéndolas en hematoxilina de Harris durante 1 minuto.

**13.** Lavado VI: se lavaron las preparaciones en agua corriente durante 5´.

**14.** Deshidratación y montaje: se deshidrataron las muestras realizando pases rápidos (20 de 30´´ cada uno) en una serie de alcoholes de graduación ascendente (70º, 96º, 100º) y se aclararon en xilol 5´. Por último se montaron con el medio 03989 Fluka Eukitt® y cubreobjetos.

El control positivo incluido para la validación de esta técnica fue también una amígdala, que mostró reactividad frente a los anticuerpos primarios.

La inmunotinción se consideró positiva cuando aparecía en el citoplasma de las células, como especificaban las casas comerciales. Para cada anticuerpo se valoró la presencia o ausencia de inmunoexpresión en las células epiteliales, regularidad del marcaje, y se determinó la intensidad de la tinción como 0= negativa, 1= ligera, 2= moderada, 3= fuerte.

## **7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

### **7.1 BASE DE DATOS**

Se empleó una base de datos que incluyó las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes, los datos de actividad endoscópica e histológica y los resultados de la inmunohistoquímica de los marcadores de microvasculatura y factores angiogénicos y linfangiogénicos.

### **7.1.1 Variables**

De cada participante se obtuvieron datos demográficos (sexo, edad); actividad endoscópica e histológica de los pacientes con EC (SES-CD)<sup>224</sup> y CU (subíndice endoscópico de Mayo)<sup>224</sup>, comportamiento de la enfermedad en EC (B1: no-penetrante no-estenosante o inflamatorio; B2: estenosante; B3: penetrante o fistulizante); localización de acuerdo a la clasificación de Montreal: EC (L1: ileal; L2: cólica; L3: ileocólica; L4: tracto gastrointestinal superior), CU (E1: proctitis; E2: colitis distal; E3: colitis extensa); hábito tabáquico; y cualquier otra información que pudiese ser relevante para la interpretación de los resultados. Para cada paciente también se obtuvo información sobre los tratamientos actuales (en caso de que los hubiera), que no deberían haberse modificado en los últimos 3 meses. Todas las variables fueron recogidas de forma anónima y codificadas. Se evaluó el posible efecto que las variables mencionadas pudiesen tener sobre los marcajes de los factores angiogénicos y linfangiogénicos.

### **7.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para las variables categóricas, se determinaron los porcentajes y sus respectivos intervalos de confianza del 95%. Para las variables cuantitativas, los datos se expresaron mediante la media aritmética  $\pm$  desviación estándar (DE). Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la normalidad de las variables continuas. Para datos no pareados, como la evaluación de las diferencias entre los sujetos control y los pacientes con EII, la comparación entre variables cuantitativas y dos grupos de variables cualitativas se realizó mediante la prueba *t* de Student cuando los valores siguieron una distribución normal, o la prueba U de Mann-Whitney, en caso contrario. El análisis de varianza o una prueba de Kruskal-Wallis como prueba no paramétrica se llevó a cabo para calcular las diferencias entre las variables continuas y cualitativas con 3 o más grupos por categorías. Para analizar la relación entre el grado



de expresión de los factores angiogénicos y las puntuaciones del índice de actividad, se determinaron de los coeficientes de correlación de Spearman y Pearson para las variables con una distribución gaussiana y no gaussiana, respectivamente. Las comparaciones de variables cualitativas entre grupos se realizaron mediante las pruebas de  $\chi^2$  o exacta de Fischer.

Se calculó el área bajo la curva ROC (Receiver Operating Characteristic) para evaluar la precisión diagnóstica de las proteínas angiogénicas para la predicción de la actividad endoscópica e histológica.

La significación estadística se asumió para valores de p inferiores a 0,05.

## **V. RESULTADOS**

---

## 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

Las características de los pacientes estudiados se encuentran resumidas en la tabla 8. Se incluyeron un total de 101 biopsias de 58 pacientes con EII (36 CU; 44 biopsias y 22 EC; 38 biopsias) y 19 controles con mucosa normal. El 15% de las endoscópicas llegaron a ciego, y en el 67% de los casos, se consiguió intubar el íleon. La edad media de los sujetos estudiados fue de  $41 \pm 14$  años, el 61% fueron mujeres. El 47% de los casos tenían enfermedad endoscópicamente activa.

Tabla 8. Características de los pacientes

		EII			
		Control	TOTAL	CU	EC
<b>N</b>		19	58	36	22
<b>Sexo</b>	<b>Mujer</b>	14 (73,7)	33 (56,9)	19 (52,8)	14(63,6)
	<b>Hombre</b>	5 (26,3)	25 (43,1)	17 (47,2)	8 (36,4)
<b>Edad al diagnóstico (media <math>\pm</math> DE)</b>		49,3 $\pm$ 10,4	37,2 $\pm$ 12,7	39,8 $\pm$ 12,4	33,9 $\pm$ 12,5
<b>Localización (EC)</b>	<b>L1 (ileal)</b>				4 (22,2)
	<b>L2 (cólica)</b>				6 (33,3)
	<b>L3 (ileocólica)</b>				7 (38,9)
	<b>L4 Tracto intestinal alto</b>				1 (5,6)
<b>Extensión de la enfermedad (CU)</b>	<b>Proctitis</b>			2 (5,6)	
	<b>Colitis izquierda</b>			23 (63,9)	
	<b>Pancolitis</b>			11 (30,6)	
<b>Medicación al reclutamiento</b>	<b>Corticoides</b>	<b>No</b>	39 (73,6)	21 (61,8)	18 (94,7)
		<b>Sí</b>	14 (26,4)	13 (38,2)	1 (5,3)
	<b>Azatioprina</b>	<b>No</b>	41 (74,5)	26(74,3)	15(75,0)
		<b>Sí</b>	14(25,5)	9(25,7)	5 ( 25)
	<b>Mercaptopurina</b>	<b>No</b>	51 (96,2)	33 (97,1)	18 (94,7)
		<b>Sí</b>	2 (3,8)	1 (2,9)	1 (5,3)
	<b>Metotrexato</b>	<b>No</b>	55 (100)	35 (100)	20 (100)
		<b>Sí</b>			
	<b>Anti-TNF<math>\alpha</math></b>	<b>No</b>	51 (92,7)	33 (94,3)	18 (90,0)
		<b>Sí</b>	4 (7,3)	2 (5,7)	2 (10,0)

EII = enfermedad inflamatoria intestinal; CU = colitis ulcerosa; EC = enfermedad de Crohn; DE = desviación estándar.

## 2. DENSIDAD CAPILAR Y EII

Los marcadores de microvaculatura sanguínea (CD34), y linfática (D2.40), presentaron una densidad capilar mayor en las muestras de pacientes con EII que en las de los controles ( $p<0,01$ , Tabla 9, figura 4A). Por tipo de EII, las mismas diferencias vistas para todos los pacientes con EII persistieron en las muestras de pacientes con CU con respecto a las de los controles ( $p<0,01$ , Tabla 9, figura 4A). Sin embargo, las densidades capilares de D2.40 y CD34 positivos en las muestras de EC no difirieron significativamente de las de los controles, aunque la densidades del marcaje fueron más elevadas (CD34:  $27,1 \pm 11,6$  frente a  $21,1 \pm 8,4$ ,  $p=0,09$ , y D2.40:  $3,1 \pm 3,6$  frente a  $1,5 \pm 1,1$ ,  $p=0,1$ ). (Figura 4A). El patrón del marcaje de ambos anticuerpos en el epitelio, se distribuyó de manera homogénea a lo largo de la mucosa (Figuras 5A y 5B). En las muestras de pacientes con EII, la tinción de la microvasculatura linfática se observó también en la parte superior de la lámina propia, y alrededor de la *muscularis mucosa*, en aquellas muestras donde la toma de biopsia fue lo bastante profunda como para poder observarla al microscopio (Figura 5B).

Igualmente, las densidades de los marcadores angiogénicos Ang-1 y Ang-2, fueron mayores en las muestras de pacientes con EII que en los controles ( $p<0,01$  y  $p<0,05$ , respectivamente) (Tabla 9, figura 4A). Al separar por tipo de enfermedad, las densidades de Ang-1, Ang-2 y Tie-2 en la mucosa de pacientes con CU fueron significativamente mayores que en los controles ( $p<0,01$ ,  $p<0,01$  y  $p<0,05$ , respectivamente) (Tabla 9). Sin embargo, no se observaron diferencias entre los pacientes con EC y los controles, siendo la densidad de Ang-2 menor incluso en las muestras de pacientes con EC que en las de los controles ( $19,9 \pm 7,2$  frente a  $20,1 \pm 4,6$ ).

Independientemente de la aparición de abscesos crípticos en el epitelio de los pacientes con EII, el patrón de tinción de Ang-1 y Ang-2 fue bastante homogéneo a los

largo de la mucosa y de la lámina propia, igual que en la mucosa de los controles (Figuras 5C y 5D). La única excepción fue el Tie-2, donde los abscesos crípticos presentaron cierto marcaje (Figura 5E).

Tabla 9. Densidad capilar en pacientes con EII y controles sanos

	CONTROL	CU	<i>p</i>	EC	<i>P</i>	EII	<i>p</i>
<b>D2.40</b>	1,5±1,1	5,1±3,7	0,0001	3,1±3,6	0,104	4,6±4,0	0,0001
<b>CD34</b>	21,1±8,4	30,3±11,5	0,01	27,1±11,6	0,09	28,6±11,8	0,01
<b>Ang-1</b>	31,7±6,0	48,3±17,4	0,0001	38,5±15,4	0,087	44,8±15,6	0,0001
<b>Ang-2</b>	20,1±4,6	24,5±6,5	0,001	19,9±7,2	0,910	23,4±7,0	0,03
<b>Tie-2</b>	26,1±5,0	29,4±6,3	0,026	26,2±4,5	0,911	28,5±5,9	0,112

*EII = enfermedad inflamatoria intestinal; CU = colitis ulcerosa; EC = enfermedad de Crohn.*

Tabla 10. Expresión del marcaje del sistema VEGF en pacientes con EII y controles sanos

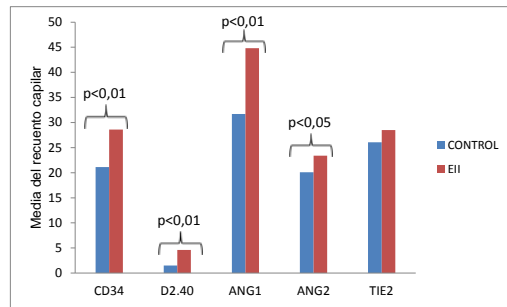
	CONTROL	CU	<i>p</i>	EC	<i>P</i>	EII	<i>p</i>
<b>VEGF-A</b>	0,6±0,6	0,9±0,7	0,339	0,6±0,9	1,0	0,9±0,7	0,41
<b>VEGF-C</b>	0,9±0,6	1,3±0,6	0,029	1,0±0,7	0,758	1,2±0,7	0,11
<b>VEGF-D</b>	0,9±0,7	1,2±0,6	0,241	1,1±0,5	0,312	1,2±0,6	0,19
<b>VEGFR-1</b>	0,7±0,5	1,0±0,6	0,026	0,6±0,6	0,585	0,9±0,7	0,20
<b>VEGFR-2</b>	0,9±0,5	1,4±0,6	0,002	0,9±0,6	0,933	1,2±0,6	0,057
<b>VEGFR-3</b>	0,6±0,5	1,2±0,8	0,001	1,0±0,6	0,070	1,1±0,7	0,007
<b>PIGF</b>	0,4±0,5	1,1±0,8	0,078	0,7±1,0	0,525	1,0±0,8	0,113

*EII = enfermedad inflamatoria intestinal; CU = colitis ulcerosa; EC = enfermedad de Crohn.*

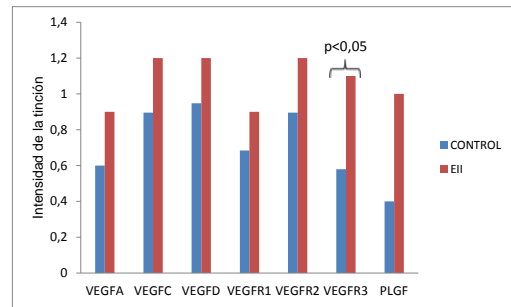
**Figura 4. Densidad capilar de D2.40, CD34 y angiopoyetinas positivos, e intensidad del marcaje del sistema VEGF en muestras de pacientes con EII y controles.**

**(4A, 4B), pacientes con EII frente a controles; (4C, 4D), pacientes con CU y controles; y (4E, 4F), pacientes con EC y controles.\*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ .**

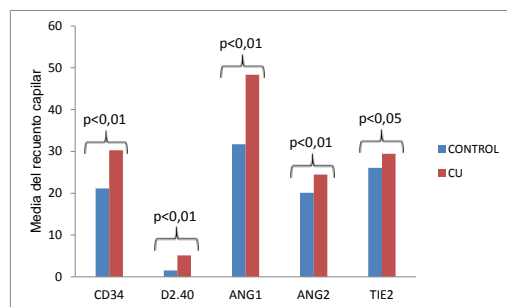
**4A) Densidad capilar de D2.40, CD34 y angiopoyetinas en pacientes con EII y controles**



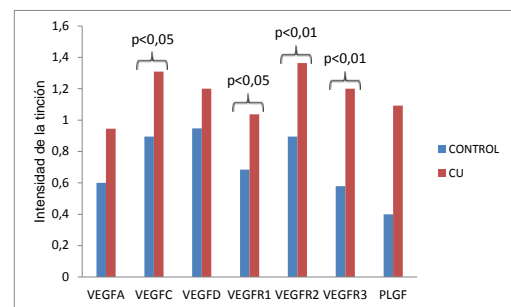
**4B) Intensidad del marcaje del sistema VEGF en pacientes con EII y controles**



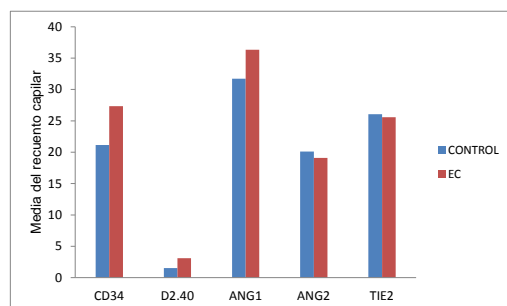
**4C) Densidad capilar de D2.40, CD34 y angiopoyetinas en pacientes con CU y controles**



**4D) intensidad del marcaje del sistema VEGF en pacientes con CU y controles**



**4E) intensidad del marcaje del sistema VEGF en pacientes con EC y controles**



**4F) Intensidad del marcaje del sistema VEGF en pacientes con EC y controles**

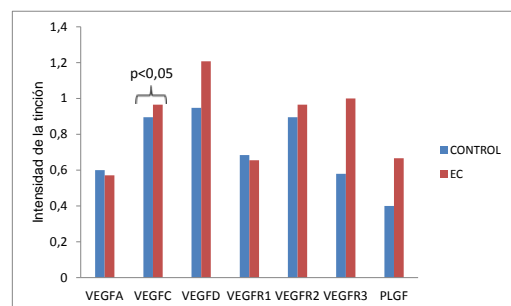
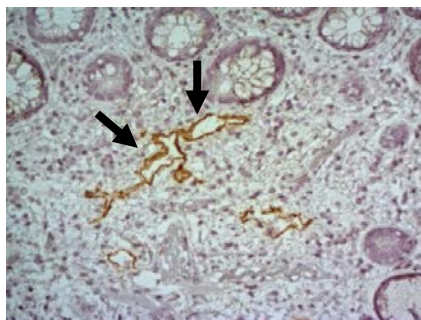


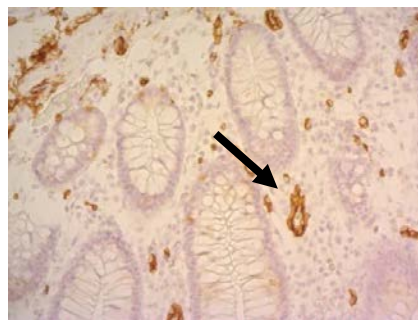
Figura 5 Positividad con A) D2-40, B) CD34, C) Ang-1, D) Ang-2 y E) Tie-2 en las membranas celulares y en los endotelios vasculares de pacientes con EII activa (x20).

Las flechas indican la localización del marcaje.

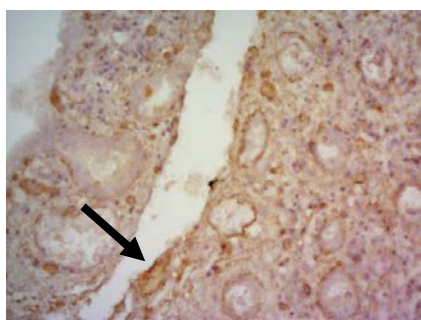
5A)



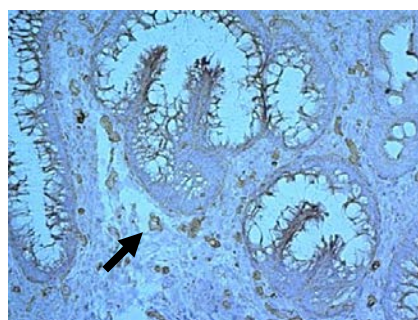
5B)



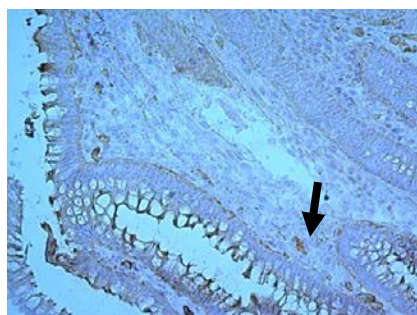
5C)



5D)



5E)



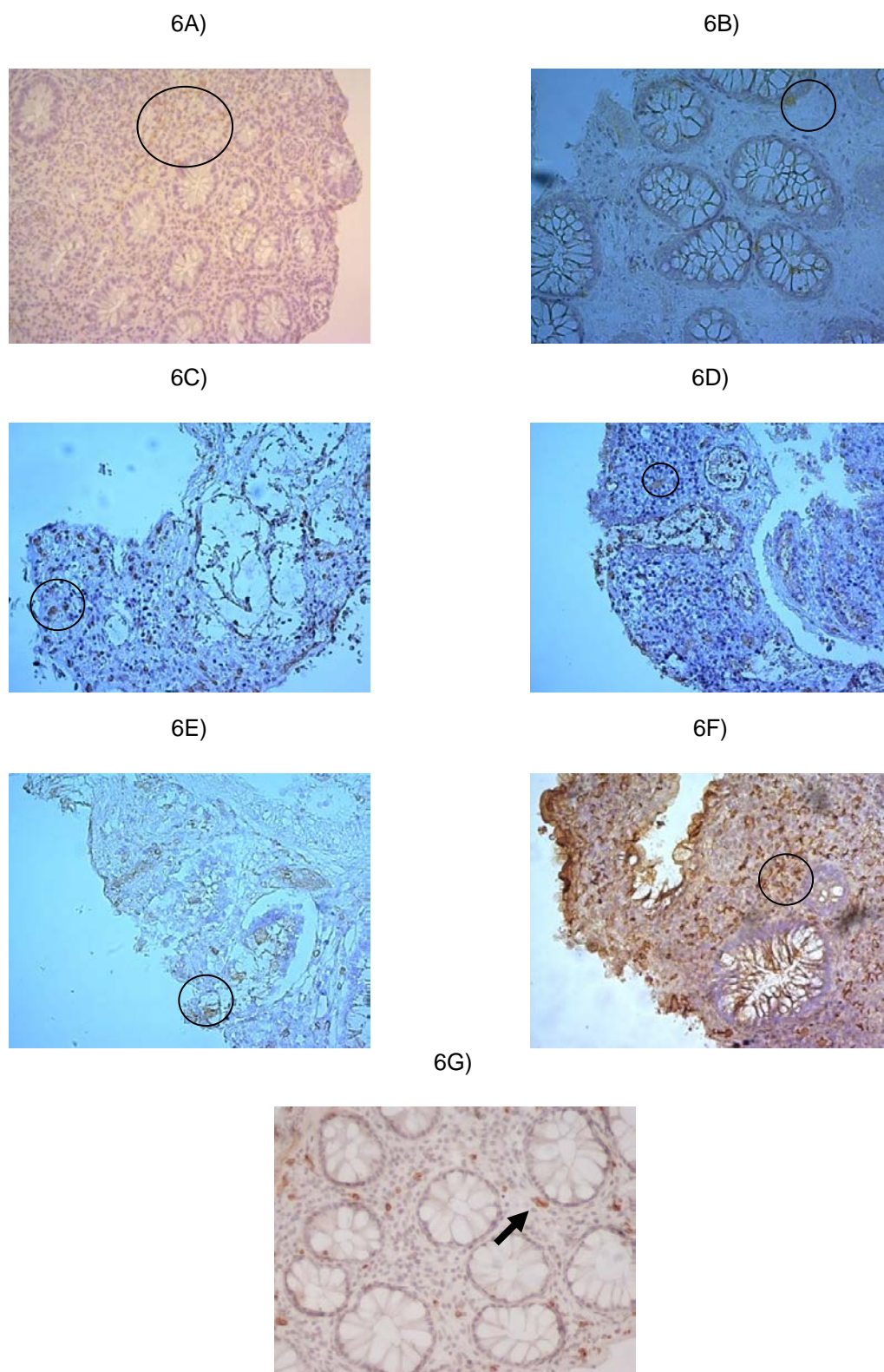
En cuanto a los factores del sistema de VEGF, sólo hubo diferencias estadísticamente significativas en la expresión de VEGFR-3 ( $p<0,01$ ), la cual fue mayor en las muestras de pacientes con EII que en los controles (Tabla 10, figura 6A). Éstas diferencias en VEGFR-3, persistieron entre las muestras de pacientes con CU y controles, dónde además, la expresión de VEGF-C, VEGFR-1 y VEGFR-2 fue también estadísticamente superior a la de los controles ( $p<0,05$ ,  $p<0,01$  y  $p<0,01$ , respectivamente, Tabla 10, figura 6B).

La tinción con VEGF-A, aunque débil tanto en las muestras con EII como en los controles, se extendió a lo largo de todo el epitelio, expresándose probablemente, en las células epiteliales, inflamatorias y en fibroblastos de la lámina propia (Figura 6A). El marcaje con PIGF fue, sin embargo, mucho más restringido a las zonas perivasculares, con un patrón similar al del CD34, aunque no tan claro como para permitir el conteo de vasos en el epitelio (Figura 6B). Los marcadores prolinfangiogénicos VEGF-C y VEGF-D, tiñeron varios grupos de células monocíticas de la mucosa y lamina propia, siendo éstas más numerosas en los pacientes con EII que en los controles, aunque no llegando a ser estadísticamente significativas, excepto para el VEGF-C en pacientes con CU, donde los agregados del infiltrado monocitario fueron más numerosos (Figuras 6C y 6D).

La expresión de los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 se pudo observar a lo largo de todo el epitelio, de manera parecida a la del VEGF-A, incluyendo probablemente células del sistema inmune y epiteliales, además de en las criptas (Figuras 6E y 6F), siendo más numerosos en los pacientes con CU, donde éstas se encuentran más afectadas y desestructuradas. El VEGFR-3 se restringió a un subgrupo de células epiteliales en los vasos linfáticos, con tinción ocasional de linfocitos, aunque el patrón no uniforme que presentaban no permitió realizar un recuento de vasos independiente (Figura 6G).



**Figura 6. Positividad con 6A) VEGF-A, 6B) PlGF, 6C) VEGF-C, 6D) VEGF-D, 6E) VEGFR-1, 6F) VEGFR-2 y 6G) VEGFR-3 en las membranas celulares y en los endotelios vasculares de pacientes con EII activa (x20). Las flechas y los círculos indican la localización del marcaje.**



### 3. DENSIDAD MICROVASCULAR EN TEJIDO NORMAL DE CONTROLES FRENTE A TEJIDO DE PACIENTES CON EII INACTIVA

Las muestras de pacientes con EII diagnosticadas endoscópicamente como mucosa normal/inactiva también mostraron una mayor densidad microvascular con expresión de D2.40, CD34 y Ang-1 que las de las muestras de biopsias de controles ( $p<0,01$ ,  $p<0,05$  y  $p<0,01$  respectivamente, Tabla 11). Estas diferencias fueron más marcadas cuando se compararon por separado las de los pacientes con CU frente a las de los controles ( $p<0,01$ ); sin embargo, el recuento capilar en las biopsias de pacientes con EC inactiva no se diferenció de éstos. Tan sólo el recuento de Ang-2 fue mayor en las muestras con CU inactiva ( $24,7 \pm 6,2$ ,  $p<0,05$ ), y menor en las de pacientes con EC inactiva ( $16,5 \pm 3,6$ ,  $p<0,05$ ) que las de los controles ( $20,1 \pm 4,6$ , tabla 7A).

En cuanto a la expresión de los factores angiogénicos de la familia del VEGF-A, solamente la expresión del marcaje con VEGFR-3 fue mayor en la mucosa de pacientes con EII inactiva que en la de los controles ( $p<0,05$ ). Al separar el análisis por enfermedad, estas diferencias continuaron en los pacientes con CU inactiva, aunque no llegaron a ser estadísticamente significativas ( $1,0 \pm 0,8$  frente a  $0,6 \pm 0,5$ ,  $p=0,061$ ). Sin embargo, la expresión de los otros dos receptores de este sistema, VEGFR-1 y VEGFR-2 sí que fue mayor en las muestras de pacientes con CU inactiva que en las de los controles ( $p<0,01$  y  $p<0,05$  respectivamente, tabla 12).

Tabla 11 Densidad capilar de D2.40, CD34 y angiopoyetinas positivos en muestras sin actividad y controles

	CONTROL	EII INACTIVA	<i>p</i>	CU INACTIVA	<i>P</i>	EC INACTIVA	<i>p</i>
<b>D2.40</b>	1,5±1,1	4,0±3,5	0,003	5,6±3,5	0,001	2,2±2,5	0,392
<b>CD34</b>	21,1±8,4	28,6±11,4	0,024	32,1±10,3	0,002	22,5±11,2	0,739
<b>Ang-1</b>	31,7±6,0	40,8±13,7	0,005	47,5±14,1	0,003	34,7±10,3	0,309
<b>Ang-2</b>	20,1±4,6	20,5±6,5	0,838	24,7±6,2	0,024	16,5±3,6	0,026
<b>Tie-2</b>	26,1±5,0	28,3±6,2	0,201	30,8±6,8	0,033	26,0±4,7	0,977

*EII = enfermedad inflamatoria intestinal; CU = colitis ulcerosa; EC = enfermedad de Crohn.*

Tabla 12. Intensidad del marcaje del sistema VEGF en muestras sin actividad y controles

	CONTROL	EII INACTIVA	<i>p</i>	CU INACTIVA	<i>P</i>	EC INACTIVA	<i>p</i>
<b>VEGF-A</b>	0,6±0,6	0,8±0,8	0,567	0,9±0,7	0,473	0,5±0,5	0,374
<b>VEGF-C</b>	0,9±0,6	1,1±0,6	0,319	1,3±0,6	0,072	0,8±0,6	0,812
<b>VEGF-D</b>	0,9±0,7	1,2±0,6	0,159	1,3±0,6	0,170	1,2±0,6	0,384
<b>VEGFR-1</b>	0,7±0,5	0,9±0,7	0,356	1,2±0,6	0,007	0,5±0,7	0,276
<b>VEGFR-2</b>	0,9±0,5	1,1±0,7	0,244	1,4±0,6	0,015	0,8±0,6	0,507
<b>VEGFR-3</b>	0,6±0,5	0,9±0,6	0,044	1,0±0,8	0,061	0,8±0,4	0,098
<b>PIGF</b>	0,4±0,5	0,8±0,8	0,289	0,9±0,8	0,186	0,3±0,5	0,178

*EII = enfermedad inflamatoria intestinal; CU = colitis ulcerosa; EC = enfermedad de Crohn.*

#### 4. DENSIDAD MICROVASCULAR EN CU FRENTE A EC

Las biopsias de los pacientes con CU mostraron mayor densidad microvascular de D2.40 y de Ang-1, Ang-2 y Tie-2 ( $p<0,05$ ,  $p<0,01$ ,  $p<0,01$  y  $p<0,05$ , respectivamente) que las de los pacientes con EC. No se encontraron diferencias en relación con el CD34 (Figura 7A). Se observaron resultados parecidos para D2.40, Ang-2, y Tie-2, entre las biopsias marcadas como inactiva por criterios endoscópicos (Tabla 13) ( $p<0,05$ ,  $p<0,01$  y  $p<0,05$ , respectivamente) y una tendencia similar hacia un mayor número de células positivas a Ang-1 ( $p=0,051$ ) y CD34 en la CU ( $p=0,07$ ). También se observaron diferencias entre las biopsias de zonas inactivas por criterios anatomopatológicos, siendo también las densidades de D2.40, Ang-1 y Ang-2 mayores en las mucosas de pacientes con CU que con EC (Tabla 14).

Los marcajes con VEGF-C, VEGFR-1 y VEGFR-2 fueron más intensos en las muestras de pacientes con CU que en las de los pacientes con EC. Al diferenciarlas entre enfermedad endoscópica y/o histológicamente activa, no se observaron

diferencias en la expresión del marcaje entre las muestras de pacientes con CU y EC activa. Sin embargo las muestras, tanto histológica como endoscópicamente inactivas, sí tuvieron una diferente expresión en el marcaje con VEGFR-1 y VEGFR-2, siendo mayor en las muestras de pacientes con CU ( $p<0,01$ ) (Tablas 15 y 16).

Tabla 13. Densidad de microvasos y angiopoyetinas en las muestras con actividad endoscópica frente a las inactivas, por tipo de EII.

	EII ACTIVA			EII INACTIVA		
	CU	EC	<i>p</i>	CU	EC	<i>p</i>
<b>CD34</b>	27,4±13,0	31,7±10,8	0,416	34,0±11,1	23,5±12,4	0,069
<b>D2.40</b>	5,3±4,3	4,8±4,9	0,801	5,4±4,0	2,1±2,8	0,024
<b>Ang-1</b>	49,7±15,3	46,7±22,0	0,714	46,0±14,0	35,1±11,0	0,051
<b>Ang-2</b>	26,2±6,1	27,2±7,8	0,752	24,2±6,9	16,8±4,0	0,003
<b>Tie-2</b>	29,5±6,1	26,7±4,5	0,327	31,0±6,9	25,8±4,4	0,042

EII = enfermedad inflamatoria intestinal; CU = colitis ulcerosa; EC = enfermedad de Crohn.

Tabla 14. Expresión del sistema VEGF en las muestras con actividad endoscópica frente a las inactivas, por tipo de EII.

	EII ACTIVA			EII INACTIVA		
	CU	EC	<i>p</i>	CU	EC	<i>p</i>
<b>VEGF-A</b>	1,0±0,7	0,8±1,0	0,611	0,9±0,8	0,8±0,7	0,270
<b>VEGF-C</b>	1,3±0,7	1,1±0,8	0,503	1,2±0,5	0,8±0,6	0,075
<b>VEGF-D</b>	1,1±0,6	1,1±0,3	0,910	1,3±0,6	1,1±0,5	0,280
<b>VEGFR-1</b>	1,0±0,7	0,8±0,4	0,407	1,2±0,5	0,4±0,7	0,001
<b>VEGFR-2</b>	1,3±0,5	1,1±0,6	0,342	1,4±0,5	0,6±0,5	0,001
<b>VEGFR-3</b>	1,3±0,8	1,0±0,9	0,361	1,1±0,7	0,8±0,4	0,206
<b>PIGF</b>	1,1±0,8	1,0±1,0	0,738	0,9±0,8	0,8±0,8	0,138

EII = enfermedad inflamatoria intestinal; CU = colitis ulcerosa; EC = enfermedad de Crohn.

Tabla 15. Densidad de microvasos y angiopoyetinas en las muestras con actividad histológica frente a las inactivas, por tipo de EII.

	EII ACTIVA			EII INACTIVA		
	CU	EC	<i>p</i>	CU	EC	<i>p</i>
<b>CD34</b>	25,4±11,9	29,2±11,3	0,412	33,4±11,0	23,5±12,4	0,120
<b>D2.40</b>	5,3±4,1	4,2±4,3	0,563	5,5±3,9	2,1±2,8	0,016
<b>Ang-1</b>	50,3±15,5	43,1±20,0	0,335	46,8±13,7	35,1±11,0	0,032
<b>Ang-2</b>	26,5±6,1	24,2±8,6	0,453	24,5±6,0	16,8±3,9	0,001
<b>Tie-2</b>	29,2±6,2	26,9±4,9	0,368	31,1±6,6	25,8±4,4	0,333

EII = enfermedad inflamatoria intestinal; CU = colitis ulcerosa; EC = enfermedad de Crohn.

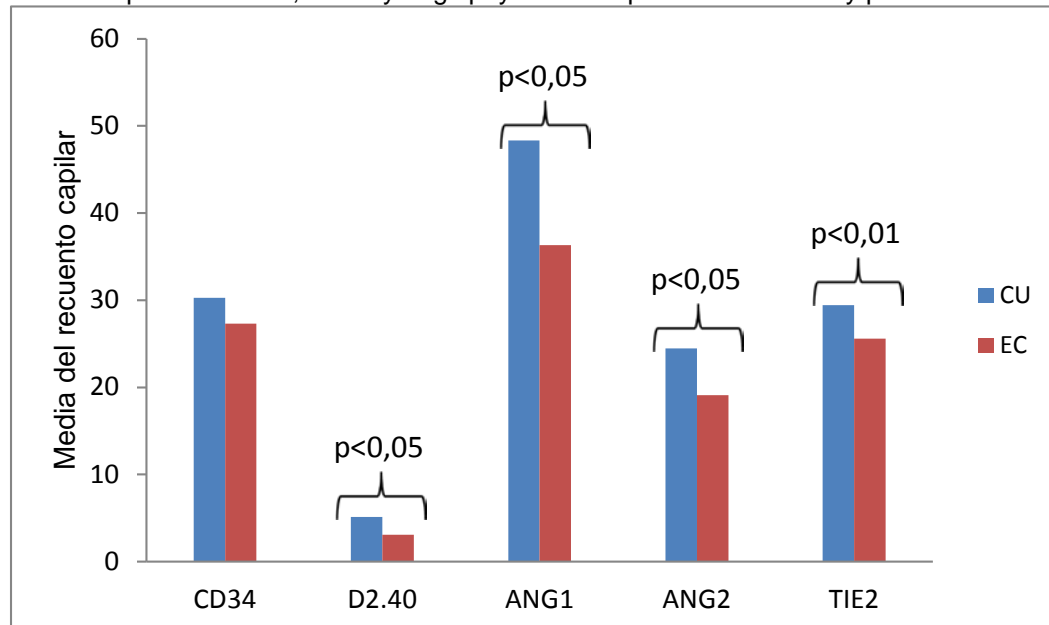
Tabla 16. Expresión del sistema VEGF en las muestras con actividad histológica frente a las inactivas, por tipo de EII.

	EII ACTIVA			EII INACTIVA		
	CU	EC	p	CU	EC	p
<b>VEGF-A</b>	1,0±0,7	0,8±1,0	0,532	0,8±0,8	0,6±0,8	0,297
<b>VEGF-C</b>	1,3±0,7	1,1±0,7	0,424	1,3±0,6	0,8±0,6	0,051
<b>VEGF-D</b>	1,0±0,6	1,2±0,4	0,366	1,3±0,6	1,1±0,5	0,304
<b>VEGFR-1</b>	0,9±0,8	0,8±0,4	0,615	1,2±0,5	0,4±0,7	0,001
<b>VEGFR-2</b>	1,4±0,5	1,2±0,6	0,366	1,3±0,6	0,6±0,5	0,003
<b>VEGFR-3</b>	1,3±0,9	1,0±0,8	0,334	1,1±0,7	0,8±0,4	0,323
<b>PIGF</b>	1,3±0,7	1,0±1,0	0,514	0,8±0,8	0,6±0,6	0,160

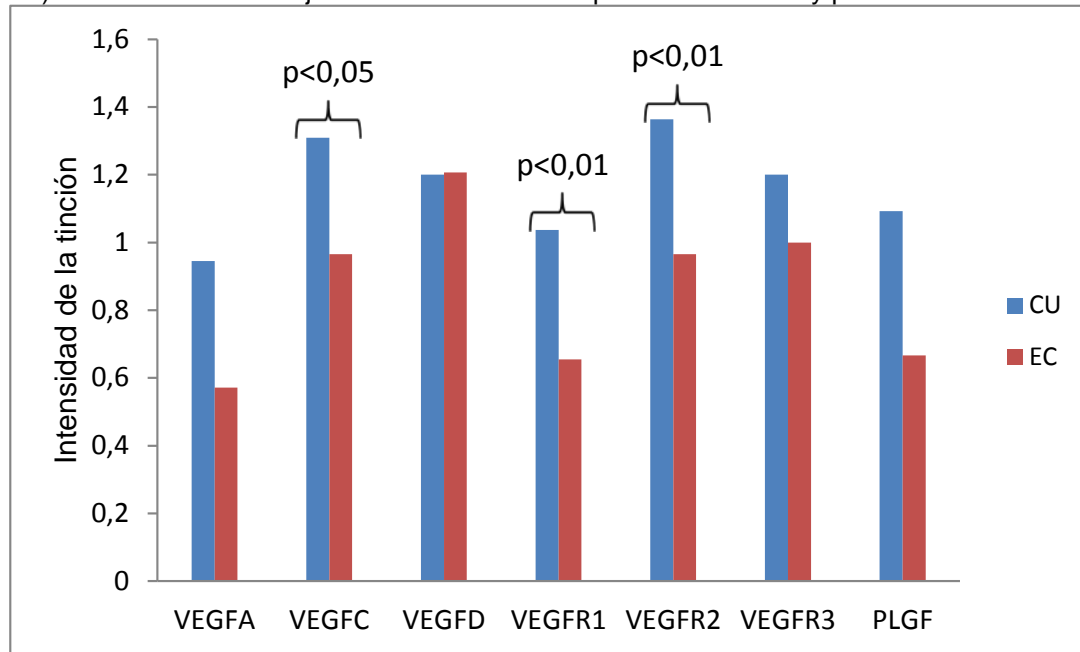
EII = enfermedad inflamatoria intestinal; CU = colitis ulcerosa; EC = enfermedad de Crohn.

Figura 7. Densidad capilar de D2.40, CD34, Angiopoyetinas positivos (7A), e intensidad del marcaje del sistema VEGF (7B) en muestras de pacientes con CU y pacientes con EC.

7A) Densidad capilar de D2.40, CD34 y angiopoyetinas en pacientes con CU y pacientes con EC.



7B) Intensidad del marcaje del sistema VEGF en pacientes con CU y pacientes con EC.



## 5. DENSIDAD DE LA MICROVASCULATURA Y ACTIVIDAD DE LA EII

Las densidades de microvasos Ang-1 y Ang-2 positivos fue mayor en las muestras de pacientes con EII con actividad endoscópica e histológica ( $p < 0,01$ ) que en las inactivas. Las diferencias con respecto a CD34 o D2.40, sin embargo, no fueron significativas ni por criterios histológicos, ni endoscópicos (Tabla 17).

La densidades de microvasos en las muestras marcadas con CD34 en muestras de pacientes con CU inactiva frente a activa fueron iguales según los diagnósticos tanto por criterios histológicos ( $p = 0,07$ ) como endoscópicos ( $p = 0,1$ ).

La expresión de los demás factores angiogénicos y linfangiogénicos de la familia de VEGF, fue mayor en las muestras de pacientes con EII tanto endoscópica, como histológicamente activas que en las inactivas, exceptuando a VEGF-C que fue menor en las muestras con actividad. VEGFR-2, VEGFR-3 y PIGF, se expresaron en mayor grado en las muestras con actividad endoscópica comparadas con las inactivas

( $p<0,05$ ). No se encontraron diferencias con respecto a los demás factores y la actividad de la enfermedad (Tabla 18).

Al analizar por tipo de EII, se observó una mayor densidad de Ang-1 y Ang-2 en las muestras con CU histológica ( $p<0,05$ ) y endoscópicamente ( $p<0,01$ ) activas frente a inactivas. Sin embargo en las muestras con EC, sólo el recuento de Ang-2 fue mayor en las muestras con actividad histológica que en las que no tenían actividad. Independientemente de que se compare la actividad endoscópica o histológica, las intensidades de los marcajes de todos los factores de la familia VEGF y de sus receptores, fueron mayores en la muestras con CU y EC activas con comparadas con las inactivas, sólo el VEGF-D, que fue menos intenso en las activas. En el análisis por enfermedad, sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas en VEGF-D por actividad histológica ( $p<0,05$ ), siendo más intenso en las muestras con CU inactiva que en las activas, y en VEGFR-2 ( $p<0,05$ ), siendo más intenso el marcaje en las muestras con actividad endoscópica que en las que no tenían actividad.

Tabla 17 Densidad de capilares D2.40, CD34 y angiopoyetinas positivos en muestras con EII activa frente a inactiva, determinada por criterios endoscópicos e histológicos.

	ACTIVIDAD HISTOLÓGICA			ACTIVIDAD ENDOSCÓPICA		
	EII ACTIVA	EII INACTIVA	<i>p</i>	EII ACTIVA	EII INACTIVA	<i>p</i>
<b>D2.40</b>	5,3±4,1	3,9±3,4	0,145	5,3±4,1	3,4±3,2	0,044
<b>CD34</b>	27,9±11,6	30,4±10,9	0,333	27,9±11,6	27,6±11,0	0,923
<b>Ang-1</b>	51,0±19,8	38,8±13,3	0,007	51,0±19,8	36,4±11,8	0,001
<b>Ang-2</b>	25,9±6,9	20,0±6,0	0,001	25,9±6,9	20,0±5,5	0,0001
<b>Tie-2</b>	29,3±6,1	27,1±6,3	0,179	29,3±6,1	26,8±5,9	0,076

*EII = enfermedad inflamatoria intestinal.*

Tabla 18 Intensidad de tinción del sistema VEGF en muestras de pacientes con CU y EC activa frente a inactiva, como se determinó por criterios endoscópicos e histológicos

	ACTIVIDAD HISTOLÓGICA			ACTIVIDAD ENDOSCÓPICA		
	EII ACTIVA	EII INACTIVA	<i>p</i>	EII ACTIVA	EII INACTIVA	<i>p</i>
<b>VEGF-A</b>	1,0±0,7	0,8±0,7	0,21	1,0±0,7	0,8±0,7	0,147
<b>VEGF-C</b>	1,3±0,7	1,1±0,6	0,22	1,3±0,7	1,1±0,6	0,093
<b>VEGF-D</b>	1,1±0,5	1,3±0,6	0,052	1,1±0,5	1,2±0,6	0,227
<b>VEGFR-1</b>	0,9±0,7	0,9±0,7	0,698	0,9±0,7	0,8±0,6	0,419
<b>VEGFR-2</b>	1,4±0,6	1,1±0,6	0,096	1,4±0,6	1,1±0,6	0,019
<b>VEGFR-3</b>	1,3±0,8	1,0±0,7	0,183	1,3±0,8	0,9±0,7	0,035
<b>PIGF</b>	1,3±0,8	0,9±0,8	0,051	1,3±0,8	0,8±0,8	0,021

## 6. GRAVEDAD DE LA ACTIVIDAD DE LA EII

El 47% (IC95%; 34-59) de los pacientes no tenía actividad endoscópica, un 21% (IC95%; 10-31) tenía actividad moderada, 24% (IC95%; 13-35) leve y 9% (IC95%; 1-16) grave (Tabla 19). Hubo diferencias significativas en la media del recuento de Ang-1 ( $p<0,05$ ) y Ang-2 ( $p<0,01$ ), y en la expresión de VEGF-A ( $p<0,05$ ) y PIGF ( $p<0,05$ ) dependiendo de la actividad endoscópica. Se encontró una mayor densidad de Ang-1 y Ang-2 y un marcaje más fuerte de VEGF-A y PIGF, cuando la actividad endoscópica fue grave comparada con enfermedad inactiva (Tabla 20).

De acuerdo con la histología, el 51% (IC95%; 38-64) de los pacientes tenía enfermedad quiescente, un 20% (IC95%; 10-31) tenía lesiones moderadas, 20% (IC95%; 10-31) leves y 8% (IC95%; 1-15) graves (Tabla 19). La expresión de VEGF-D ( $p<0,05$ ), PIGF ( $p<0,05$ ) y VEGFR-3 ( $p<0,01$ ), y la media de recuento de Ang-1 ( $p<0,05$ ) y Ang-2 ( $p<0,01$ ) también fueron diferentes en base a la actividad histológica. Estas expresiones aumentaron en paralelo con la gravedad de las lesiones histológicas excepto la de VEGF-D, que disminuyó (Tabla 21).



Tabla 19. Grado de actividad endoscópica de los pacientes, e histológica de los pacientes y las muestras de tejido.

		EII			
		Control	TOTAL	CU	EC
Actividad Endoscópica (pacientes)	Inactiva	27 (46,6) IC95% [33,8%-59,4%]	16 (44,4) IC95% [28,2%-60,6%]	11 (50,0) IC95% [29,1%-70,9%]	
	Leve	12 (20,7) IC95% [10,3%-31,1%]	7 (19,4) IC95% [6,5%-32,3%]	5 (22,7) IC95% [5,2%-40,2%]	
	Modera da	14 (24,1) IC95% [13,0%-35,1%]	8 (22,2) IC95% [8,6%-35,8%]	6 (27,3) IC95% [8,7%-45,9%]	
	Grave	5 (8,6) IC95% [1,4%-15,8%]	5 (13,9) IC95% [2,6%-25,2%]	0 (0,0)	
Actividad Endoscópica (muestras tejidos)	Inactiva	49 (59,8) IC95% [47,2%-72,4%]	31 (58,5) IC95% [42,4%-74,6%]	18 (62,1) IC95% [41,8%-82,4%]	
	Leve	15 (18,3) IC95% [8,4%-28,3%]	9 (17,0) IC95% [4,7%-29,3%]	6 (20,7) IC95% [3,8%-37,6%]	
	Modera da	12 (14,6) IC95% [5,5%-23,7%]	7 (13,2) IC95% [2,1%-24,3%]	5 (17,2) IC95% [1,4%-33,0%]	
	Grave	6 (7,3) IC95% [0,6%-14,0%]	6 (11,3) IC95% [1,0%-21,6%]	0 (0,0)	
Actividad Histológica	Inactiva	40 (51,3) IC95% [38,4%-64,2%]	23 (44,2) IC95% [28,0%-60,4%]	17 (65,4) IC95% [45,5%-85,3%]	
	Leve	16 (20,5) IC95% [10,1%-30,9%]	12 (23,1) IC95% [9,30%-36,9%]	4 (15,4) IC95% [0,3%-30,5%]	
	Modera da	16 (20,5) IC95% [10,1%-30,9%]	11 (21,2) IC95% [7,9%-34,6%]	5 (19,2) IC95% [2,8%-35,7%]	
	Grave	6 (7,7) IC95% [0,8%-14,6%]	6 (11,5) IC95% [1,1%-21,9%]	0 (0,0)	

EII = enfermedad inflamatoria intestinal; CU = colitis ulcerosa; EC = enfermedad de Crohn; IC95% = Intervalo de confianza del 95%.

Las diferencias observadas con el grado de actividad tomando los resultados de las muestras de pacientes con CU, persistieron únicamente para Ang-2 ( $p<0,05$ ) y VEGF-D ( $p<0,05$ ), donde su densidad y marcaje fueron mayores, y menores respectivamente de manera gradual con el incremento de la actividad tanto endoscópica como histológica. Con respecto a las muestras de pacientes con EC, solo la densidad de Ang-2 aumentó con la actividad endoscópica ( $p<0,05$ ) y/o histológica ( $p<0,01$ ) de la enfermedad de manera estadísticamente significativa.

Tabla 20 Densidad capilar e intensidad del marcaje según el grado de actividad endoscópica de la EII

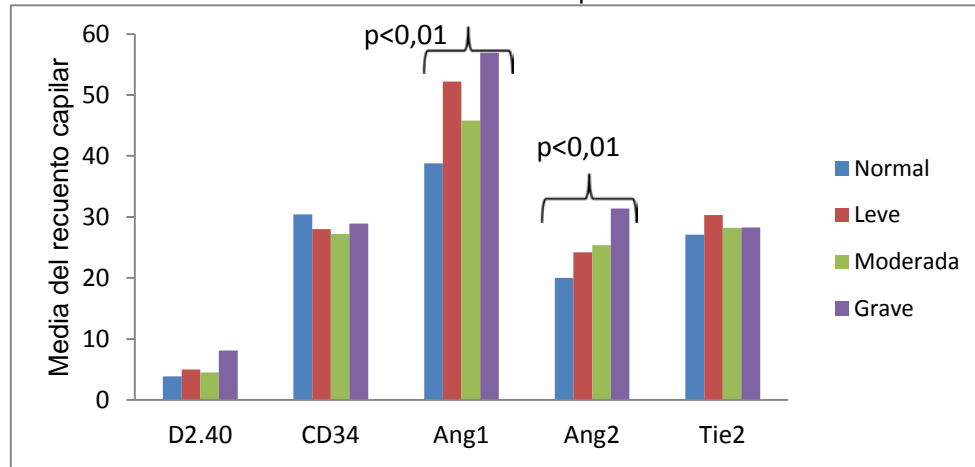
	D2.40	CD34	Ang-1	Ang-2	Tie-2	VEGF-A	VEGF-C	VEGF-D	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	PIGF
<b>Normal</b>	3,9±3,4	30,4±10,9	38,8±13,3	20,0±6,0	27,1±6,3	0,8±0,7	1,1±0,6	1,3±0,6	0,9±0,7	1,1±0,6	1,0±0,7	0,9±0,8
<b>Leve</b>	5,0±4,7	28,0±12,7	52,2±22,4	24,2±6,9	30,3±7,2	0,8±0,6	1,2±0,8	1,1±0,5	0,7±0,7	1,3±0,6	1,1±0,9	1±0,8
<b>Moderada</b>	4,5±3,5	27,2±10,7	45,8±18,5	25,4±7,1	28,2±5,6	0,9±0,7	1,3±0,8	1,2±0,4	1,1±0,7	1,5±0,5	1,3±0,8	1,2±0,8
<b>Grave</b>	8,1±2,7	28,9±12,6	56,9±14,8	31,4±4,5	28,3±4,0	1,7±0,5	1,7±0,5	0,7±0,5	1,2±0,4	1,3±0,5	1,7±0,7	1,8±0,4
<b>P</b>	0,175	0,8	0,020	0,001	0,478	0,049	0,241	0,061	0,402	0,290	0,177	0,041

Tabla 21 Densidad capilar e intensidad del marcaje según el grado de actividad histológica de la EII.

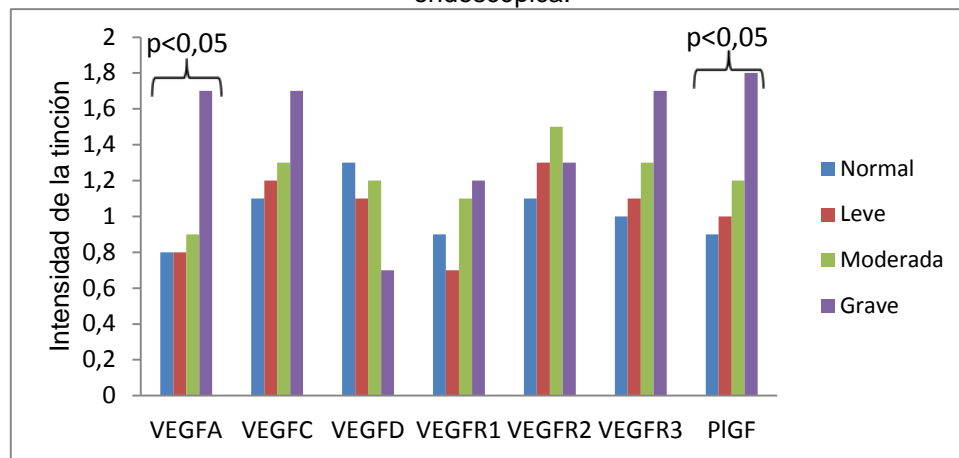
	D2.40	CD34	Ang-1	Ang-2	Tie-2	VEGF-A	VEGF-C	VEGF-D	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	PIGF
<b>Inactiva</b>	3,7±3,2	29,3±11,0	38,6±13,3	19,8±6,0	27,3±6,3	0,8±0,7	1,1±0,6	1,3±0,6	0,8±0,7	1,2±0,6	1,0±0,7	0,8±0,8
<b>Leve</b>	4,5±4,7	29,4±14,2	46,4±18,6	24,2±7,6	26,0±6,1	1,1±0,7	1,1±0,7	1,1±0,5	0,9±0,7	1,1±0,6	0,9±0,9	1±0,8
<b>Moderada</b>	5,5±4,0	29,7±9,1	51,5±22,4	24,9±5,9	32,0±6,1	0,7±0,7	1,4±0,7	1,2±0,4	0,9±0,6	1,4±0,5	1,5±0,6	1,1±0,7
<b>Grave</b>	7,2±3,1	28,6±11,3	57,1±14,9	31,6±4,6	28,4±3,8	1,5±0,5	1,7±0,5	0,7±0,5	1,3±0,5	1,5±0,5	2±0,7	1,8±0,4
<b>P</b>	0,140	0,998	0,025	0,0001	0,074	0,081	0,1	0,049	0,391	0,233	0,001	0,039

**Figura 8. Densidad capilar de D2.40, CD34, Angiopoyetinas positivas, e intensidad del marcaje del sistema VEGF según el grado de actividad endoscópica (8A y 8B) e histológica (8C y 8D) de la EII. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$**

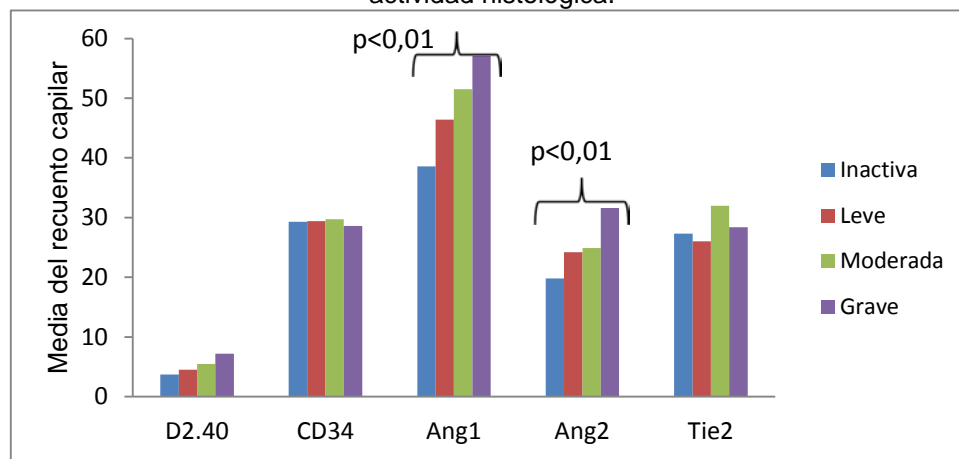
8A) Densidad capilar de D2.40, CD34 y angiopoyetinas en pacientes con EII, según el grado de actividad endoscópica.



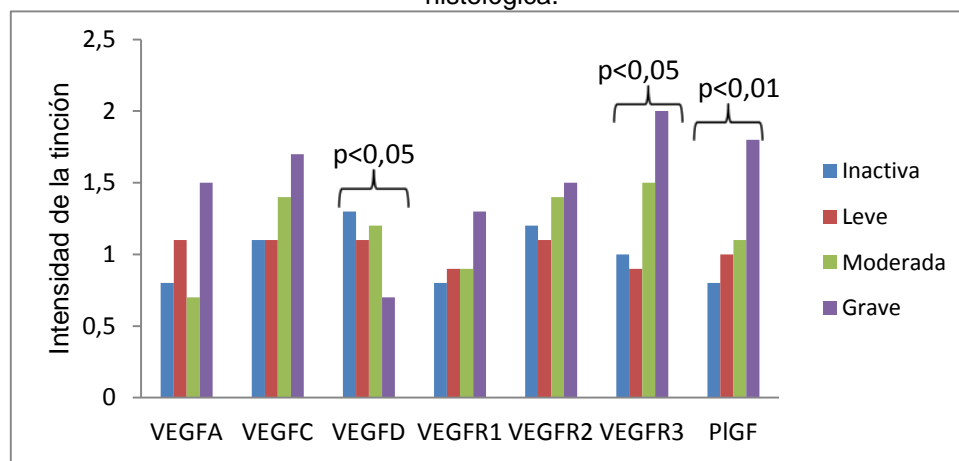
8B) Intensidad del marcaje del sistema VEGF en pacientes con EII, según el grado de actividad endoscópica.



8C) Densidad capilar de D2.40, CD34 y angiopoyetinas en pacientes con EII, según el grado de actividad histológica.



8D) Intensidad del marcaje del sistema VEGF en pacientes con EII, según el grado de actividad histológica.



## 7. CORRELACIONES ENTRE LA ACTIVIDAD HISTOLÓGICA Y ENDOSCÓPICA, Y EL MARCAJE CAPILAR

Con respecto a la actividad histológica, se encontraron correlaciones positivas ( $p < 0,05$ ) entre el grado de actividad y la densidad de Ang-1 ( $r=0,4$ ), Ang-2 ( $r=0,5$ ), y expresión de PIGF ( $r=0,4$ ), VEGF-C ( $r=0,3$ ), y VEGFR-3 ( $r=0,3$ ), y negativa de VEGF-D ( $r=-0,3$ ). También hubo correlación positiva entre la densidad de vasos linfáticos y el grado de actividad de anatomía patológica ( $p=0,034$ ).

Por otro lado, se encontraron correlaciones positivas ( $p < 0,05$ ) entre la actividad endoscópica y la densidad de Ang-1( $r=0,4$ ), Ang-2( $r=0,5$ ), y la expresión de PIGF( $r=0,4$ ), y negativa de VEGF-D( $r=-0,3$ ). No se objetivó correlación entre los grados de actividad y los marcajes con D2.40 y CD34, ni entre éstos marcadores y los factores angiogénicos estudiados.

## 8. EXPRESIÓN DE ANG-1 COMO FACTOR DE DESARROLLO ANGIOGÉNICO DE LA EII

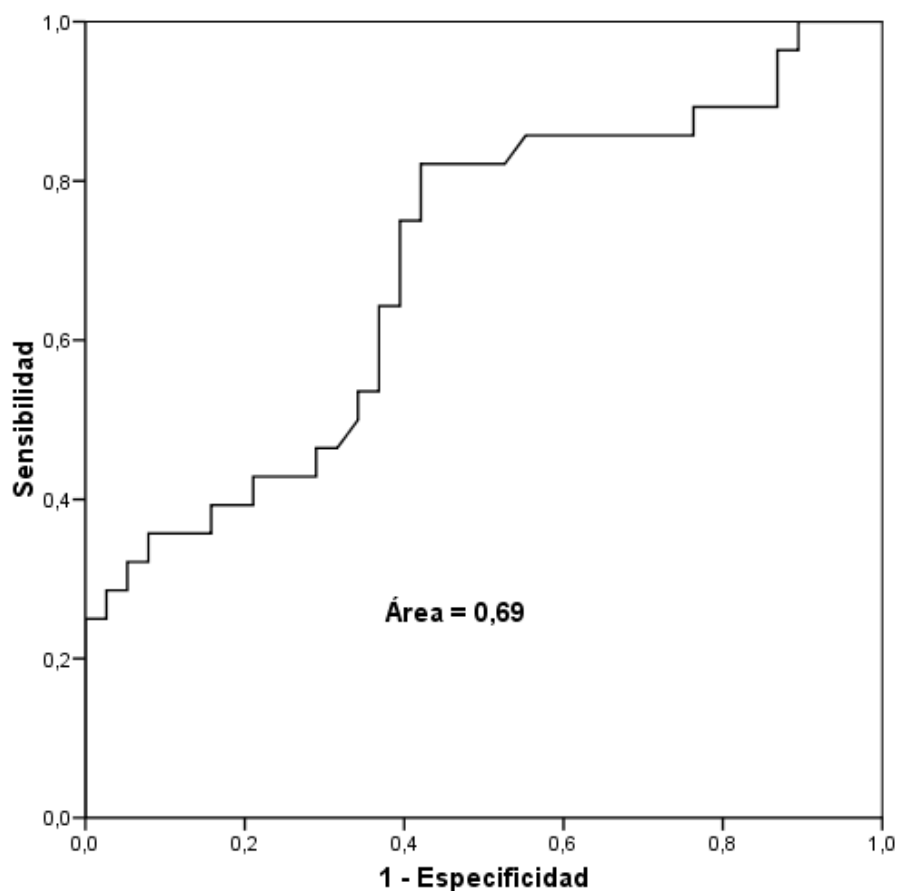
La utilidad de este factor de desarrollo angiogénico como predictor independiente de la actividad de la enfermedad se evaluó mediante el área bajo la curva ROC. Ang-1 fue el mejor factor predictivo independiente de actividad endoscópica e histológica de la EII comparado con los marcadores de angiogénesis y linfangiogénesis, y del resto de factores angiogénicos y linfangiogénicos. En la EII en general, alto recuento de capilares positivos al marcaje con Ang-1 fue un predictor independiente de actividad endoscópica con un área bajo la curva de 0,69 (IC95%; 0,51-0,85), con el mejor punto de corte en 39,8, y una sensibilidad del 89% y una especificidad del 56% (Figura 9A).

Por otro lado, en la CU, la mayor densidad de capilares Ang-1 positivos fue también un predictor independiente de actividad endoscópica, con un área bajo la curva fue de 0,72 (IC95%; 0,58-0,82), con el mejor punto de corte en 42,2, con una sensibilidad y una especificidad del 53% y 67% respectivamente (Figura 9B).

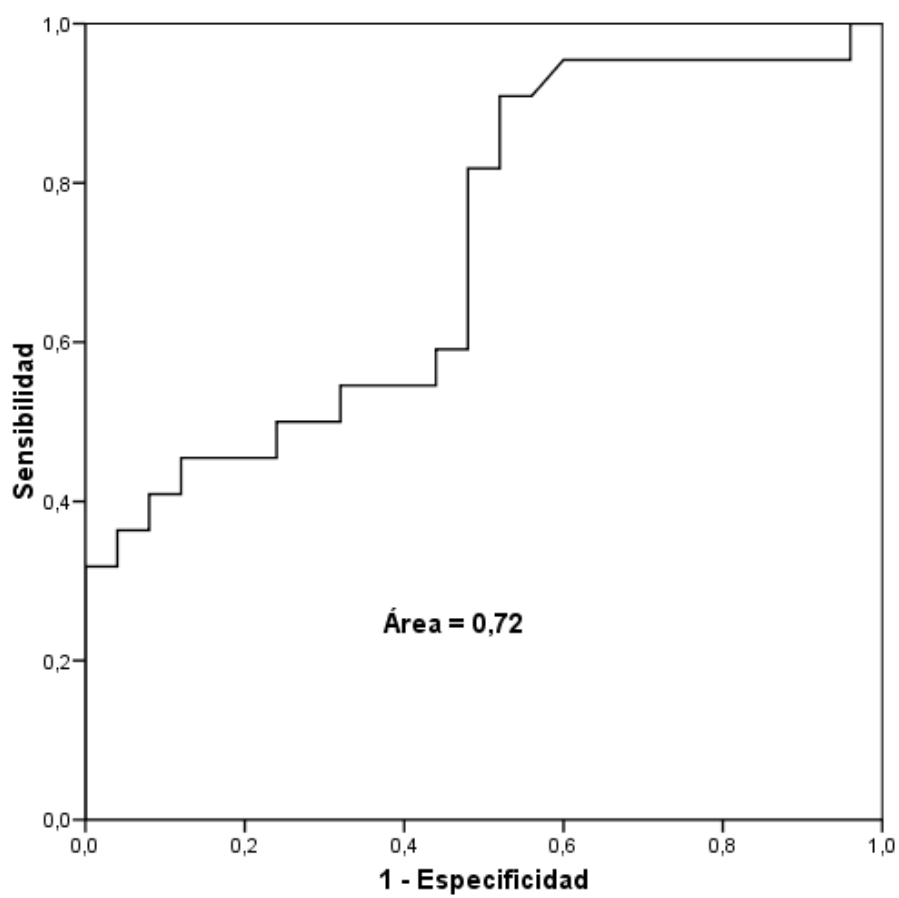
El área bajo la curva del resto de los marcadores estudiados fue menor de 0,7 en todos los casos. En la EC, el área bajo la curva fue menor de 0,6 en todos los marcadores, incluido Ang-1. El recuento capilar con Ang-1 como predictor independiente de la actividad histológica en la EII, resultó en un área bajo la curva de 0,68. Para el resto de marcadores el área fue menor de 0,6 en todos los casos.

**Figura 9. Área bajo la curva COR de Ang-1 como predictor de actividad endoscópica en pacientes con EII (9A) y CU (9B).**

9A)



9 B)



## **VI. DISCUSIÓN**

---



---

Los resultados del presente estudio sugieren una asociación entre el desarrollo angiogénico y linfangiogénico, por una parte, y la actividad endoscópica e histológica de la EII, por otra.

Los marcadores de las células endoteliales, como CD34 y D2.40, se han empleado previamente para identificar vasos sanguíneos y linfáticos primarios, respectivamente, tanto en tejido normal como en el de pacientes con diversas enfermedades inflamatorias, incluida la EII<sup>230</sup>. Ambos anticuerpos marcan vasos ya formados en el colon<sup>231</sup>; sin embargo, no se ha estudiado en profundidad la relación entre el desarrollo de la microvasculatura cólica y la expresión de los factores angiogénicos (entre los que destacan la familia del VEGF-A y el sistema de las angiopoyetinas) a nivel tisular en la EII.

En nuestro estudio, la densidad de la microvasculatura sanguínea fue mayor en las muestras de pacientes con CU y EC que en las de los sujetos control, siendo más marcada esta diferencia en el caso de los pacientes con CU. Diversos estudios han mostrado una mayor densidad de capilares sanguíneos en la mucosa cólica de los pacientes con EII en comparación con los controles sanos<sup>232-235</sup>; sin embargo, otros estudios no han demostrado diferencias a este respecto<sup>234, 236</sup>.

En estudios de modelos murinos con colitis inducida por DSS, donde a los ratones se les inyectaron células madre, se ha probado que, una vez diferenciadas en células epiteliales, éstas contribuyen significativamente a la mejoría clínica e histológica la colitis en estos animales. Esta reparación epitelial fue mediada por una mayor vasculogénesis, que aumentó la inducción de la actividad de Tie-2 en los sitios de mucosa dañada<sup>237</sup>. Por otro lado, un estudio inmunohistoquímico de la expresión de CD34 en pacientes con reservorio ileal, confirmó que la red capilar sanguínea de la mucosa del colon se encontraba aumentada<sup>238</sup>, lo que sugiere que el desarrollo de la

---

microvasculatura tiene un papel reparador en la EII, especialmente en la CU, intensificándose en los momentos de mayor actividad.

En otro estudio de muestras de mucosa de pacientes con CU, se cuantificó la expresión de VEGF-A junto con la densidad microvascular (CD34), y se correlacionó con la respuesta clínica a la terapia con esteroides. El resultado del recuento de la microvasculatura fue casi constante, independientemente del grupo al que pertenecieran (baja o alta sensibilidad a esteroides), aunque los pacientes con CU y baja sensibilidad a esteroides se caracterizaron por una microvasculatura hipertrofiada con un diámetro de los microvasos significativamente mayor. Así, la interrupción del proceso de curación o la alteración de la microcirculación, podría estar implicada en la CU refractaria a esteroides<sup>69</sup>.

Más recientemente, se han estudiado muestras cólicas de pacientes con CU con distintos grados de fibrosis, donde se identificó el marcaje con CD34 con los telocitos, un tipo de célula del estroma cuyo papel en el tracto gastrointestinal está relacionado con el soporte mecánico, la señalización y la modulación de la motilidad intestinal. Con el incremento de la fibrosis, se observó una pérdida de este tipo de células, probablemente debido a la remodelación de la pared intestinal<sup>239</sup>. Estos datos podrían explicar los resultados de nuestro estudio, donde no se apreciaron diferencias en el recuento de los vasos marcados con CD34 con el aumento del grado de actividad de la enfermedad. Además, la densidad del marcaje con CD34 en las muestras de pacientes con EII inactiva, fue similar a la que presentaban las muestras de los pacientes con EII activa, y en ambos casos las densidades fueron mayores que las encontradas en los controles.

Conocemos por estudios realizados en ratones *knockout* para CD34 que este marcador está implicado en la migración celular de los eosinófilos, y éstos a su vez

---

expresan esta molécula (CD34) una vez se encuentran infiltrando la mucosa cólica, aunque no se ha encontrado relación con el proceso proliferativo de la enfermedad<sup>240</sup>.

En nuestro estudio, la densidad de vasos linfáticos fue mayor en las muestras de pacientes con CU y EC que en las de los controles, aunque únicamente el recuento linfangiogénico alcanzó la significación estadística en el caso de las muestras de pacientes con CU; lo cual coincide con los resultados de estudios previos, en los que se ha descrito una mayor densidad linfática tanto en los pacientes con EII en comparación con los controles<sup>219, 241, 242</sup>.

La dificultad de encontrar diferencias en el grado de desarrollo linfático en la EII según la actividad de las muestras se debe probablemente a que el aumento de la densidad de los vasos linfáticos en el colon es una característica de esta enfermedad y está presente incluso en las áreas no inflamadas. Además, se ha descrito previamente que, a pesar de esa mayor densidad celular, las células endoteliales linfáticas no siempre terminan organizándose en capilares funcionales<sup>243, 244</sup>. Así, en nuestro estudio, los valores de densidad microvascular linfática se encontraron elevados en las zonas con enfermedad inactiva comparados con los de los controles, aunque no llegaron a alcanzar los valores de las zonas con actividad. Sin embargo, en modelos murinos con deficiencias de IL-10 que generan colitis espontáneamente, se ha observado una densidad y dimensión reducida de los vasos linfáticos, junto con un aumento del edema inflamatorio<sup>245</sup>.

En nuestro estudio, además, la mucosa cólica de pacientes con CU presentó una densidad linfática mayor que las de aquellos con EC. Tan sólo existe un estudio en la literatura que describe un mayor desarrollo linfático en mucosa cólica de pacientes con CU<sup>219</sup>, mientras que otros autores han referido un desarrollo linfático mayor en la mucosa cólica de pacientes con EC<sup>221</sup>. Estos resultados resaltan la dificultad de

---

distinguir entre EC y CU en función de las diferencias en las densidades capilares linfáticas en el tejido cólico.

Se sabe que la capa muscular intestinal responsable de la actividad motora es la que desarrolla una red linfática densa y laberíntica por proliferación vascular, que consiste en proyecciones endoteliales linfáticas delgadas y división de los vasos preexistentes<sup>29, 246</sup>. De este modo, el estudio inmunohistoquímico de la mucosa cólica proveniente de biopsias endoscópicas restringe la investigación a la zona más superficial del epitelio cólico, pudiendo pasar por alto lesiones más profundas. Esta limitación es mayor en la EC ya que, como ocurre con el resto de las lesiones, el desarrollo linfático es transmural, mientras que en la CU se encuentra confinado a la mucosa<sup>221</sup>.

Otros autores, sin embargo, han confirmado que la proliferación de los vasos linfáticos en la mucosa cólica de pacientes con CU activa es más intensa dentro de la lámina propia<sup>219</sup>. Los mismos autores observaron que con la restauración de la morfología estructural de la mucosa, se recuperó la integridad de la lámina propia en lo que respecta a la distribución de los vasos linfáticos<sup>219</sup>.

Estudios previos de este marcador en pacientes con EII muestran que existe una interconexión entre el endotelio linfático y las células de los granulomas, debido principalmente a que los granulomas obstruyen estos vasos en todas las capas del intestino en pacientes con EC. Un drenaje linfático comprometido conduce a edema, pudiendo agravar la enfermedad<sup>247</sup>.

La proliferación de vasos linfáticos en la EII se ha estudiado también en las lesiones de componente fibrótico, donde los capilares linfáticos también son predominantes en las zonas donde la fibrosis reemplaza a la inflamación crónica<sup>241</sup>. Otros autores han demostrado que existe una asociación entre el incremento de los vasos linfáticos dentro de la mucosa y las alteraciones en el tejido en la enfermedad, incluyendo la

penetración de la mucosa por las fibras musculares y los cambios filiformes en la mucosa<sup>220</sup>.

Las terapias que mejoran el flujo linfático en el intestino pueden reducir el riesgo de recurrencia de la enfermedad<sup>242</sup>. En pacientes sometidos a estricturoplastia, Tonelli et al. estudiaron la alteración del curso y las características de los vasos linfáticos en las estenosis intestinales de pacientes con EC. Mediante una inyección de Patent Blue V en la subserosa, evidenciaron que existe una correlación entre el espesor de la pared parietal y la gravedad de la enfermedad. La desaparición de las alteraciones linfáticas después de una estricturoplastia se asoció a una regresión de las lesiones inflamatorias<sup>248</sup>.

En relación con los marcadores proliferativos de vasos linfáticos de la familia VEGF, en nuestro estudio los pacientes con CU tuvieron una mayor expresión de VEGFR-3, junto con VEGF-C, pero no de VEGF-D, que los controles; este resultado no se constató en las muestras de pacientes con EC. Además, las muestras con actividad endoscópica de estos pacientes con EC tuvieron una mayor expresión de VEGFR-3, junto a VEGF-D, en lugar de VEGF-C. Se sabe que la regulación al alza del VEGF-C probablemente contribuye a la regeneración linfática a través de la activación de su receptor VEGFR-3 en las células endoteliales linfáticas<sup>29</sup>; sin embargo, la relación de VEGF-D con la EII ha sido menos estudiada. En un estudio anterior de nuestro grupo, encontramos que los niveles de sobrenadante de cultivos de mucosa de pacientes con EII, tanto de VEGF-C como de VEGF-D, fueron mayores en las muestras de pacientes que de controles, diferencias que persistieron al comparar pacientes con enfermedad activa frente a inactiva<sup>249</sup>. Estas diferencias no se observaron en el VEGFR-3, aunque en este caso se cuantificó el receptor soluble.

Estudios *in vivo* de la capa muscular del yeyuno de ratas mediante inmunohistoquímica han evidenciado que, junto a la regeneración linfática, que avanzó

de manera progresiva hasta la maduración vascular, el VEGF-C se encuentra fuertemente expresado en una subpoblación de células intersticiales, siendo la intensidad de su expresión cercana a la del VEGFR-3<sup>250</sup>. En un modelo murino de artritis inflamatoria crónica, una enfermedad autoinmune similar en algunos aspectos a la EII, la inhibición de la linfangiogénesis y el drenaje linfático a través de VEGFR-3 incrementó la gravedad de la inflamación en estos animales<sup>164</sup>. Recientemente, se ha descubierto que la ruta VEGF-C/VEGFR-3 regula la plasticidad y activación de los macrófagos (MΦ) tanto en cultivos como *in vivo*, dando lugar a un fenotipo híbrido M1-M2. Se conoce que existe un incremento del número de macrófagos proinflamatorios (M1) en tejido de pacientes con EC. Por el contrario, los macrófagos antiinflamatorios (M2) pueden tener algún papel en la CU, dada la preponderancia de las citocinas Th2 en esta variante de EII, lo cual podría explicar las diferencias observadas en este estudio entre las muestras de pacientes con EC y CU<sup>251, 252</sup>.

Estudios en hemangioendotelioma kaposiforme sugieren que VEGFR-3, implicado en este tipo de lesiones, es capaz de activarse de una manera autocrina<sup>253</sup>. Finalmente, se ha encontrado que la expresión de VEGFR-3 en muestras de pacientes con cáncer colorrectal era menor a medida que se analiza tejido más cercano al tumor, mientras que el factor VEGF-C era detectado tanto en el epitelio benigno como en el maligno<sup>254</sup>.

En otro estudio comparativo de células endoteliales de la microvasculatura de tejido tumoral y el correspondiente no neoplásico, aisladas de pacientes con cáncer colorrectal, se encontró un patrón diferente para cada individuo al medir la expresión de VEGFR-3 mediante ELISA. Además, los mismos autores demostraron, mediante cultivo en condiciones de hipoxia, que los niveles de VEGFR-3 no variaban, lo que sugiere que este factor presenta un comportamiento “resistente” a la falta de oxígeno en la microvasculatura cólica<sup>255</sup>.

En la mucosa duodenal de pacientes con linfangiectasia intestinal idiopática, la expresión de mRNA de VEGFR-3 fue mayor en las muestras de pacientes con esta enfermedad, pero la de VEGF-C y VEGF-D fue mucho menor, comparada con la de los controles. Estos hallazgos en la mucosa duodenal son similares a los descritos en nuestro estudio en mucosa cólica, donde la expresión de VEGFR-3 fue mayor, y la de VEGF-D menor, pero no la de VEGF-C, en las muestras de mucosa cólica de los pacientes con IBD comparadas con las de los controles<sup>256</sup>.

Más recientemente, se ha caracterizado la linfangiogénesis en intestino delgado mediante ingeniería de tejidos en ratas. La proporción de células neointestinales positivas a VEGFR-3 crecieron en número y formaron estructuras tubulares similares a los vasos linfáticos, que se pudieron distinguir de los vasos sanguíneos positivos a CD34<sup>257</sup>. Sin embargo, en los vasos linfáticos normales del intestino grueso se ha descrito en general poca expresión de VEGF-C, VEGFR-3 y VEGFR-2<sup>258</sup>. Estudios *in vitro* de inhibición selectiva de VEGFR-2 y VEGFR-3 en células endoteliales linfáticas apuntan hacia una señalización cooperativa de VEGFR-2 con VEGFR-3 necesaria para la migración, organización y la proliferación linfática, pero no para la formación tubular. El bloqueo únicamente de VEGFR-3 no tiene efecto en la organización y funcionalidad de los capilares linfáticos<sup>259</sup>.

En nuestro estudio, el marcaje de VEGFR-2 fue mucho mayor en las muestras con EII que en los controles, patrón que se mantuvo al comprar las muestras de pacientes con CU (pero no con EC) frente a los controles. Este marcaje reproduce el de estudios inmunohistoquímicos previos, que revelan que VEGFR-2 se encuentra incrementado tanto en muestras de pacientes con EII como en ratones con colitis inducida por DSS, en comparación con los controles<sup>55</sup>; sin embargo, en otros estudios previos de nuestro grupo no se encontraron diferencias en los niveles de VEGFR-2 en sobrenadante de cultivos primarios de biopsias de pacientes con enfermedad activa con respecto a los controles sanos, ni en el suero de pacientes con EII y controles sanos<sup>59, 63, 249</sup>.

Se ha descrito recientemente que existen dos formas solubles del receptor VEGFR-2, una de las cuales se encuentra truncada mediante *splicing* alternativo. Este VEGFR-2 truncado, una vez liberado al medio, compite con VEGFR-3 por la unión a VEGF-C. Esto podría explicar las diferencias que encontramos entre los niveles de este receptor soluble y el que se encuentra unido a la membrana, en la mucosa de los pacientes con EII<sup>260</sup>.

Por otro lado, hemos encontrado que los dos factores de crecimiento vascular; VEGF-A y PlGF, que compiten por su unión al receptor VEGFR-1, se expresan de manera diferente en la mucosa cólica de los pacientes con EII comparada con la de los controles. La tinción con los dos factores fue más intensa en las muestras de los pacientes con EII activa frente a inactiva, aunque estas diferencias sólo alcanzaron la significación estadística en el caso del PlGF. La expresión tanto de PlGF como de VEGF-A fue mayor en las muestras de pacientes con CU activa frente a inactiva, diferencias que no se observaron en las muestras de los pacientes con EC.

Existen pocos estudios que evalúen el PlGF en la EII. En un trabajo previo de nuestro grupo, encontramos diferencias significativas en los niveles de este factor, y de VEGF-A, en sobrenadante de cultivos de mucosa cólica tanto entre pacientes con EII (CU y EC) con y sin actividad, como entre pacientes y controles<sup>249</sup>. Además, en otro estudio de angiogénesis en modelos murinos con delección del gen de PlGF, donde se indujo a los ratones una colitis mediante DSS y, tras la administración de PlGF recombinante, el desarrollo angiogénico se redujo en comparación con los ratones control<sup>136</sup>.

De todos los factores incluidos en el presente estudio, el VEGF-A ha sido, sin duda, el más estudiado en relación con la EII, especialmente a nivel serológico. El aumento de los niveles de VEGF-A en la EII ha sido confirmado por otros estudios, en los que se han constatado niveles séricos significativamente mayores de VEGF-A en



pacientes con EC y CU activas que en los controles<sup>16, 55, 61-63, 249, 261</sup>. No obstante, a nivel tisular, se ha descrito una intensidad de inmunotinción más débil en los pacientes con EC activa que en los controles sanos, y una expresión similar a éstos en los pacientes con CU<sup>64</sup>, resultados semejantes a los mostrados en el presente estudio. Estas variaciones podrían justificarse por el origen de estos factores en la mucosa, puesto que se ha evidenciado una correlación entre la tinción de linfocitos y la de VEGF-A en la lámina propia de pacientes tanto con EC como con CU, por lo que la acumulación intersticial de los linfocitos productores de VEGF-A en la mucosa inflamada podría ser la causa de parte de los mecanismos inflamatorios de la EII<sup>68</sup>.

Los dos miembros del sistema de angiopoyetinas evaluados en el presente estudio, Ang-1 y Ang-2, poseen la capacidad de inhibir o aumentar la angiogénesis a través de su unión al receptor Tie-2<sup>38, 262</sup>. En nuestro estudio se evidenció un mayor recuento de la expresión de Ang-1 y Ang-2 en las muestras de los pacientes con EII, comparadas con las de los controles. Además, su expresión aumentó en paralelo a la actividad endoscópica y a la gravedad de las lesiones histológicas.

Además observamos que la mucosa cólica de pacientes con enfermedad endoscópicamente activa presentó una mayor densidad media de Ang-1 y Ang-2 en comparación con las muestras de pacientes con EII inactiva. Además, su expresión se localizó en áreas de alta densidad de microvasos linfáticos. En las muestras de pacientes con CU activa, se comprobó que la densidad media de Ang-1 y Ang-2 fue mayor que en las de los pacientes que no presentaban actividad. Estos resultados son muy similares a los de otro estudio realizado en muestras cólicas de pacientes con actividad y en remisión, donde las muestras de los pacientes con CU en remisión mostraron una intensidad de tinción significativamente menor para Ang-1, Ang-2, y Tie-2<sup>212</sup>. Sin embargo, los autores no encontraron diferencias cuando se compararon los pacientes con EC activa e inactiva.

En consonancia con estos resultados, en un estudio previo de nuestro grupo, donde se evaluaron las diferencias en los niveles solubles del sistema de angiopoyetinas tanto en suero, como en sobrenadante de cultivo de muestras de la mucosa en pacientes con EII con y sin actividad (endoscópica, histológica y clínica<sup>249, 263</sup>), se encontró que los niveles en suero de Ang-1 fueron mayores en pacientes con EII endoscópicamente activa, en comparación con los que no presentaban actividad. En el sobrenadante del cultivo, los niveles de todas las angiopoietinas estudiadas (Ang-1, Ang-2 y su receptor Tie-2) fueron mayores en pacientes con enfermedad activa en comparación con los que tenían una EII inactiva, y los niveles de Ang-2 de pacientes en remisión fueron incluso más bajos que los de los controles.

Probablemente, la explicación de estas diferencias sea que durante los períodos de inactividad un descenso en los niveles de Ang-2 podría indicar el fin del reclutamiento de las células endoteliales, aunque el equilibrio angiogénico inicial no quede totalmente restaurado. Además, al igual que con el marcaje inmunohistoquímico aquí estudiado, las concentraciones de Ang-1 en suero y mucosa se modificaron en paralelo con la gravedad de las lesiones.

En el presente estudio se encontraron correlaciones positivas entre la actividad endoscópica y el recuento de Ang-1, Ang-2 y la expresión de PIGF, y una correlación negativa entre la actividad endoscópica y la expresión de VEGF-D. Asimismo, la expresión de VEGF-D, PIGF y VEGFR-3, y la media de recuento de Ang-1 y Ang-2, también fueron diferentes dependiendo de la actividad histológica. Por último, no se halló ninguna correlación entre los grados de actividad y los marcajes con D2.40 y CD34.

El factor angiogénico Ang-1 ha mostrado ser un marcador independiente de actividad en nuestro estudio, a nivel tanto endoscópico como histológico, con un área bajo la curva ROC de 0,7 para el diagnóstico de actividad endoscópica de la CU. Estos

---

resultados son similares a los encontrados por Yosizaki et al. en un estudio de pacientes con CU<sup>212</sup>, donde observaron que la expresión del marcaje inmunohistoquímico con Ang-1 presentaba buena correlación con la actividad histológica de la enfermedad.

Aun así, debemos ser cautelosos con la interpretación de estos resultados, puesto que el área bajo la curva ROC para Ang-1 en nuestro estudio se encontraba en torno a 0,7, una cifra menor que la descrita en estudios anteriores para Ang-1 soluble en sobrenadante de cultivos de mucosa cólica<sup>249, 263</sup>. Debido a que tanto Ang-1, como Ang-2 ejercen sus efectos a través del receptor Tie-2, el cual se encuentra sobre todo expresado en las células endoteliales, el estudio de los mecanismos que inducen la expresión de sus ligandos Ang-1 y Ang-2, en los diferentes tipos celulares de la mucosa cólica podría arrojar más luz sobre el origen y comportamiento de este tipo de factores durante los periodos activos de la enfermedad. Por lo tanto, el estudio inmunohistoquímico de las angiopoyetinas se podría considerar como un método diagnóstico complementario para evaluar la actividad de la enfermedad.

Actualmente, las técnicas de inmunotinción son la mejor manera de correlacionar el patrón microvascular de las lesiones con el resultado histológico y endoscópico. Sin embargo, la principal limitación de este tipo de estudios en la mucosa cólica de pacientes con EI es que es necesaria la realización de una endoscopia.

En el futuro, la ampliación de esta investigación con el estudio de las células productoras de estos factores angiogénicos y linfangiogénicos, podría aportar nuevos datos que permitan predecir los brotes de actividad de la enfermedad y ayudar a entender los diferentes procesos que tienen lugar en el desarrollo de la microvasculatura en la CU y la EC.

## **VII. CONCLUSIONES**

---

1. La microvasculatura angiogénica y linfangiogénica tiene una mayor densidad en la mucosa cólica de los pacientes con EII que en la de los controles sanos, lo que sugiere la existencia de una angiogénesis y linfangiogénesis alteradas en la patogenia de esta enfermedad.
2. En la mucosa cólica de los pacientes con CU existe un mayor desarrollo linfático y angiogénico que en la de aquellos con EC, caracterizado por una alteración del conjunto VEGF-C, -D y su receptor VEGFR-3.
3. La densidad linfática en la mucosa cólica de los pacientes con EII, incluso en remisión endoscópica, es mayor que en la de los sujetos sanos.
4. La sobreexpresión de VEGFR-2, VEGF-A y PIGF en los pacientes con EII activa sugiere la existencia de una sinergia entre la angiogénesis y la linfangiogénesis a través de la vía VEGFR-2.
5. La expresión de VEGF-A, -D, -R3, PIGF y la densidad de Ang-1 y -2 en los pacientes con EII es mayor en las áreas cólicas con una afectación endoscópica e histológica más intensa.
6. Ang-1 es un marcador de actividad endoscópica e histológica de la CU.
7. La densidad microvascular de los factores del sistema de angiopoyetinas Ang-1 y Ang-2, y la intensidad de la expresión de PIGF en muestras de mucosa cólica se correlacionan con la actividad endoscópica e histológica de la EII.

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**

---

1. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1989; 170: 2-6; discussion 16-19.
2. Satsangi J, Morecroft J, Shah NB, Nimmo E. Genetics of inflammatory bowel disease: scientific and clinical implications. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 3-18.
3. Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Reinisch W, Geboes K, Barakauskiene A, et al. European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis* 2008; 2: 1-23.
4. Cabre E, Manosa M, Garcia-Sanchez V, Gutierrez A, Ricart E, Esteve M, et al. Phenotypic concordance in familial inflammatory bowel disease (IBD). Results of a nationwide IBD Spanish database. *J Crohns Colitis* 2014; 8: 654-661.
5. Sands BE. From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2004; 126: 1518-1532.
6. Cohen RD, Woseth DM, Thisted RA, Hanauer SB. A meta-analysis and overview of the literature on treatment options for left-sided ulcerative colitis and ulcerative proctitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1263-1276.
7. Matsumoto T, Nakamura S, Shimizu M, Iida M. Significance of appendiceal involvement in patients with ulcerative colitis. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 180-185.
8. DeRoche TC, Xiao SY, Liu X. Histological evaluation in ulcerative colitis. *Gastroenterol Rep (Oxf)* 2014; 2: 178-192.
9. Andus T, Gross V. Etiology and pathophysiology of inflammatory bowel disease--environmental factors. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 29-43.
10. Russel MG, Stockbrugger RW. Epidemiology of inflammatory bowel disease: an update. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 417-427.
11. Morahan G, Morel L. Genetics of autoimmune diseases in humans and in animal models. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 803-811.
12. Bamias G, Martin C, Mishina M, Ross WG, Rivera-Nieves J, Marini M, et al. Proinflammatory effects of TH2 cytokines in a murine model of chronic small intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2005; 128: 654-666.
13. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease. Current concepts of pathogenesis and implications for therapy. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2002; 48: 215-226.
14. Katz JA, Itoh J, Fiocchi C. Pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 1999; 15: 291-297.
15. Linares PM, Algaba A, Fernández-Contreras ME, Guerra I, Chaparro M, Rodríguez-Agulló JL, et al. Relationship between levels of angiogenic and lymphangiogenic factors (ALF) and the extension, endoscopic activity, and acute phase reactants (APR) in patients with ulcerative colitis (UC). *Journal of Crohn's and Colitis* 2012; 6: S30-S31.
16. Kanazawa S, Tsunoda T, Onuma E, Majima T, Kagiya M, Kikuchi K. VEGF, basic-FGF, and TGF-beta in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 822-828.
17. Danese S, Sans M, Spencer DM, Beck I, Donate F, Plunkett ML, et al. Angiogenesis blockade as a new therapeutic approach to experimental colitis. *Gut* 2007; 56: 855-862.
18. Pedica F, Ligorio C, Tonelli P, Bartolini S, Baccarini P. Lymphangiogenesis in Crohn's disease: an immunohistochemical study using monoclonal antibody D2-40. *Virchows Arch* 2008; 452: 57-63.
19. Alexander JS, Chaitanya GV, Grisham MB, Boktor M. Emerging roles of lymphatics in inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1207 Suppl 1: E75-85.
20. Pousa ID, Gisbert JP, Mate J. [Vascular development in inflammatory bowel disease]. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29: 414-421.
21. Felmeden DC, Blann AD, Lip GY. Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease. *Eur Heart J* 2003; 24: 586-603.
22. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-674.
23. Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med* 2006; 57: 1-18.

24. Halin C, Detmar M. Chapter 1. Inflammation, angiogenesis, and lymphangiogenesis. *Methods Enzymol* 2008; 445: 1-25.
25. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 2005; 109: 227-241.
26. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31.
27. Schroeder M, Viezens L, Fuhrhop I, Ruther W, Schaefer C, Schwarzloh B, et al. Angiogenic growth factors in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2013; 33:523-7.
28. Halin C, Tobler NE, Vigl B, Brown LF, Detmar M. VEGF-A produced by chronically inflamed tissue induces lymphangiogenesis in draining lymph nodes. *Blood* 2007; 110: 3158-3167.
29. Shimoda H, Kato S. A model for lymphatic regeneration in tissue repair of the intestinal muscle coat. *Int Rev Cytol* 2006; 250: 73-108.
30. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 2005; 438: 946-953.
31. Cao Y. Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 735-743.
32. Cueni LN, Detmar M. New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2167-2177.
33. Hatoum OA, Heidemann J, Binion DG. The intestinal microvasculature as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1072: 78-97.
34. Danese S, Sans M, de la Motte C, Graziani C, West G, Phillips MH, et al. Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2006; 130: 2060-2073.
35. Sandor Z, Deng XM, Khomenko T, Tarnawski AS, Szabo S. Altered angiogenic balance in ulcerative colitis: a key to impaired healing? *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 350: 147-150.
36. Chidlow JH, Jr., Langston W, Greer JJ, Ostanin D, Abdelbaqi M, Houghton J, et al. Differential angiogenic regulation of experimental colitis. *Am J Pathol* 2006; 169: 2014-2030.
37. Pousa ID, Mate J, Gisbert JP. Angiogenesis in inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Invest* 2008; 38: 73-81.
38. Linares PM, Gisbert JP. Role of growth factors in the development of lymphangiogenesis driven by inflammatory bowel disease: a review. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 1814-1821.
39. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.
40. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* 2000; 55: 15-35; discussion 35-16.
41. Partanen TA, Paavonen K. Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans. *Microsc Res Tech* 2001; 55: 108-121.
42. Liang Y, Hyder SM. Proliferation of endothelial and tumor epithelial cells by progestin-induced vascular endothelial growth factor from human breast cancer cells: paracrine and autocrine effects. *Endocrinology* 2005; 146: 3632-3641.
43. Mohammed RA, Green A, El-Shikh S, Paish EC, Ellis IO, Martin SG. Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors -A, -C and -D in breast cancer and their relationship with angio- and lymphangiogenesis. *Br J Cancer* 2007; 96: 1092-1100.
44. Mylona E, Alexandrou P, Giannopoulou I, Liapis G, Sofia M, Keramopoulos A, et al. The prognostic value of vascular endothelial growth factors (VEGFs)-A and -B and their receptor, VEGFR-1, in invasive breast carcinoma. *Gynecol Oncol* 2007; 104: 557-563.
45. Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, Alitalo K. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10: 528-535.



46. Fox SB, Gasparini G, Harris AL. Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *Lancet Oncol* 2001; 2: 278-289.
47. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219: 983-985.
48. Ferrara N, Bunting S. Vascular endothelial growth factor, a specific regulator of angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1996; 5: 35-44.
49. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 2002; 29: 10-14.
50. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353-364.
51. Restucci B, Borzacchiello G, Maiolino P, Martano M, Paciello O, Papparella S. Expression of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1 in canine mammary tumours. *J Comp Pathol* 2004; 130: 99-104.
52. Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, Berse B, Nagy JA, Sotrel A, et al. Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. *J Exp Med* 1991; 174: 1275-1278.
53. Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* 2002; 196: 1497-1506.
54. Kunstfeld R, Hirakawa S, Hong YK, Schacht V, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, et al. Induction of cutaneous delayed-type hypersensitivity reactions in VEGF-A transgenic mice results in chronic skin inflammation associated with persistent lymphatic hyperplasia. *Blood* 2004; 104: 1048-1057.
55. Scaldaferri F, Vetrano S, Sans M, Arena V, Straface G, Stigliano E, et al. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2009; 136: 585-595 e585.
56. Hirakawa S, Hong YK, Harvey N, Schacht V, Matsuda K, Libermann T, et al. Identification of vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Am J Pathol* 2003; 162: 575-586.
57. Cao R, Eriksson A, Kubo H, Alitalo K, Cao Y, Thyberg J. Comparative evaluation of FGF-2-, VEGF-A-, and VEGF-C-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability. *Circ Res* 2004; 94: 664-670.
58. Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, Kajiya K, Brown LF, Detmar M. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med* 2005; 201: 1089-1099.
59. Pousa ID, Mate J, Salcedo-Mora X, Abreu MT, Moreno-Otero R, Gisbert JP. Role of vascular endothelial growth factor and angiopoietin systems in serum of Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 61-67.
60. Cimpean AM, Seclaman E, Ceausu R, Gaje P, Feflea S, Anghel A, et al. VEGF-A/HGF induce Prox-1 expression in the chick embryo chorioallantoic membrane lymphatic vasculature. *Clin Exp Med* 2010; 10: 169-172.
61. Griga T, Tromm A, Spranger J, May B. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 504-508.
62. Azzam N. Angiogenesis and inflammatory bowel disease. *Saudi J Gastroenterol* 2007; 13: 37-38.
63. Duenas Pousa I, Mate Jimenez J, Salcedo Mora X, Abreu MT, Moreno Otero R, Gisbert JP. Analysis of soluble angiogenic factors in Crohn's disease: a preliminary study. *Gastroenterol Hepatol* 2007; 30: 518-524.
64. Kapsoritakis A, Sfiridaki A, Maltezos E, Simopoulos K, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. Vascular endothelial growth factor in inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 418-422.

65. Magro F, Araujo F, Pereira P, Meireles E, Diniz-Ribeiro M, Velosom FT. Soluble selectins, sICAM, sVCAM, and angiogenic proteins in different activity groups of patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1265-1274.
66. Griga T, Voigt E, Gretzer B, Brasch F, May B. Increased production of vascular endothelial growth factor by intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 920-923.
67. Griga T, Werner S, Koller M, Tromm A, May B. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in Crohn's disease: increased production by peripheral blood mononuclear cells and decreased VEGF165 labeling of peripheral CD14+ monocytes. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1196-1201.
68. Griga T, May B, Pfisterer O, Muller KM, Brasch F. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 116-123.
69. Hanabata N, Sasaki Y, Tanaka M, Tsuji T, Hatada Y, Hada R, et al. Vascular endothelial growth factor expression and microvessel parameters of colonic mucosa correlate with sensitivity to steroid in patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 188-193.
70. Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Armellini E, Morera R, Ricevuti L, Cazzola P, et al. Serum bFGF and VEGF correlate respectively with bowel wall thickness and intramural blood flow in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 573-577.
71. Schaffler A, Furst A, Buchler C, Paul G, Rogler G, Scholmerich J, et al. Vascular endothelial growth factor secretion from mesenteric adipose tissue and from creeping fat in Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1419-1423.
72. Ando Y, Inaba M, Sakaguchi Y, Tsuda M, Quan GK, Omae M, et al. Subcutaneous adipose tissue-derived stem cells facilitate colonic mucosal recovery from 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis in rats. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 826-838.
73. Beddy D, Watson RW, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. Increased vascular endothelial growth factor production in fibroblasts isolated from strictures in patients with Crohn's disease. *Br J Surg* 2004; 91: 72-77.
74. Taha Y, Raab Y, Larsson A, Carlson M, Loof L, Gerdin B, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)--a possible mediator of inflammation and mucosal permeability in patients with collagenous colitis. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 109-115.
75. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996; 15: 290-298.
76. Salven P, Lymboussaki A, Heikkila P, Jaaskela-Saari H, Enholm B, Aase K, et al. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol* 1998; 153: 103-108.
77. Kurebayashi J, Otsuki T, Kunisue H, Mikami Y, Tanaka K, Yamamoto S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) family members in breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 977-981.
78. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001; 7: 192-198.
79. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997; 276: 1423-1425.
80. Oh SJ, Jeltsch MM, Birkenhager R, McCarthy JE, Weich HA, Christ B, et al. VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. *Dev Biol* 1997; 188: 96-109.
81. Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, et al. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J* 2001; 20: 672-682.

82. Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Yla-Herttuala S, Jaattela M, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* 2001; 61: 1786-1790.
83. Krishnan J, Kirkin V, Steffen A, Hegen M, Weih D, Tomarev S, et al. Differential in vivo and in vitro expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in tumors and its relationship to lymphatic metastasis in immunocompetent rats. *Cancer Res* 2003; 63: 713-722.
84. Li YS, Kaneko M, Amatyia VJ, Takeshima Y, Arihiro K, Inai K. Expression of vascular endothelial growth factor-C and its receptor in invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Pathol Int* 2006; 56: 256-261.
85. van der Schaft DW, Pauwels P, Hulsmans S, Zimmermann M, van de Poll-Franse LV, Griffioen AW. Absence of lymphangiogenesis in ductal breast cancer at the primary tumor site. *Cancer Lett* 2007; 254: 128-136.
86. Mylona E, Nomikos A, Alexandrou P, Giannopoulou I, Keramopoulos A, Nakopoulou L. Lymphatic and blood vessel morphometry in invasive breast carcinomas: relation with proliferation and VEGF-C and -D proteins expression. *Histol Histopathol* 2007; 22: 825-835.
87. Stacker SA, Stenvers K, Caesar C, Vitali A, Domagala T, Nice E, et al. Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J Biol Chem* 1999; 274: 32127-32136.
88. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001; 7: 186-191.
89. Achen MG, Stacker SA. The vascular endothelial growth factor family; proteins which guide the development of the vasculature. *Int J Exp Pathol* 1998; 79: 255-265.
90. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 3566-3570.
91. Stacker SA, Vitali A, Caesar C, Domagala T, Groenen LC, Nice E, et al. A mutant form of vascular endothelial growth factor (VEGF) that lacks VEGF receptor-2 activation retains the ability to induce vascular permeability. *J Biol Chem* 1999; 274: 34884-34892.
92. Yamada Y, Nezu J, Shimane M, Hirata Y. Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D. *Genomics* 1997; 42: 483-488.
93. White JD, Hewett PW, Kosuge D, McCulloch T, Enholm BC, Carmichael J, et al. Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 1669-1675.
94. Currie MJ, Hanrahan V, Gunningham SP, Morrin HR, Frampton C, Han C, et al. Expression of vascular endothelial growth factor D is associated with hypoxia inducible factor (HIF-1 $\alpha$ ) and the HIF-1 $\alpha$  target gene DEC1, but not lymph node metastasis in primary human breast carcinomas. *J Clin Pathol* 2004; 57: 829-834.
95. Achen MG, Williams RA, Minekus MP, Thornton GE, Stenvers K, Rogers PA, et al. Localization of vascular endothelial growth factor-D in malignant melanoma suggests a role in tumour angiogenesis. *J Pathol* 2001; 193: 147-154.
96. Dewerchin M, Carmeliet P. PlGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2(8).
97. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 9267-9271.
98. Hauser S, Weich HA. A heparin-binding form of placenta growth factor (PlGF-2) is expressed in human umbilical vein endothelial cells and in placenta. *Growth Factors* 1993; 9: 259-268.
99. Cao Y, Ji WR, Qi P, Rosin A. Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 235: 493-498.

100. Yang W, Ahn H, Hinrichs M, Torry RJ, Torry DS. Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PlGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells. *J Reprod Immunol* 2003; 60: 53-60.
101. Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 10705-10709.
102. Migdal M, Huppertz B, Tessler S, Comforti A, Shibuya M, Reich R, et al. Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J Biol Chem* 1998; 273: 22272-22278.
103. Persico MG, Vincenti V, DiPalma T. Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF). *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237: 31-40.
104. Ziche M, Maglione D, Ribatti D, Morbidelli L, Lago CT, Battisti M, et al. Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Lab Invest* 1997; 76: 517-531.
105. Yonekura H, Sakurai S, Liu X, Migita H, Wang H, Yamagishi S, et al. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B and C expression in microvascular endothelial cells and pericytes. Implication in autocrine and paracrine regulation of angiogenesis. *J Biol Chem* 1999; 274: 35172-35178.
106. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001; 7: 575-583.
107. Adini A, Kornaga T, Firoozbakht F, Benjamin LE. Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages. *Cancer Res* 2002; 62: 2749-2752.
108. Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, et al. Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell* 2007; 131: 463-475.
109. Schmidt T, Kharabi Masouleh B, Loges S, Cauwenberghs S, Fraisl P, Maes C, et al. Loss or inhibition of stromal-derived PlGF prolongs survival of mice with imatinib-resistant Bcr-Abl1(+) leukemia. *Cancer Cell* 2011; 19: 740-753.
110. Bellik L, Vinci MC, Filippi S, Ledda F, Parenti A. Intracellular pathways triggered by the selective FLT-1-agonist placental growth factor in vascular smooth muscle cells exposed to hypoxia. *Br J Pharmacol* 2005; 146: 568-575.
111. Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, et al. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med* 2002; 8: 841-849.
112. Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, et al. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 2002; 8: 831-840.
113. Pipp F, Heil M, Issbrucker K, Ziegelhoeffer T, Martin S, van den Heuvel J, et al. VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ Res* 2003; 92: 378-385.
114. Rafii S, Avecilla S, Shmelkov S, Shido K, Tejada R, Moore MA, et al. Angiogenic factors reconstitute hematopoiesis by recruiting stem cells from bone marrow microenvironment. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 996: 49-60.
115. Scholz D, Elsaesser H, Sauer A, Friedrich C, Luttun A, Carmeliet P, et al. Bone marrow transplantation abolishes inhibition of arteriogenesis in placenta growth factor (PlGF) -/- mice. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 177-184.
116. Selvaraj SK, Giri RK, Perelman N, Johnson C, Malik P, Kalra VK. Mechanism of monocyte activation and expression of proinflammatory cytochemokines by placenta growth factor. *Blood* 2003; 102: 1515-1524.

117. Lin YL, Liang YC, Chiang BL. Placental growth factor down-regulates type 1 T helper immune response by modulating the function of dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 1473-1480.
118. Rolny C, Mazzone M, Tugues S, Laoui D, Johansson I, Coulon C, et al. HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF. *Cancer Cell* 2011; 19: 31-44.
119. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 1994; 269: 25646-25654.
120. Roy H, Bhardwaj S, Babu M, Jauhiainen S, Herzig KH, Bellu AR, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of placental growth factor to perivascular tissue induces angiogenesis via upregulation of the expression of endogenous vascular endothelial growth factor-A. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 1422-1428.
121. Marcellini M, De Luca N, Riccioni T, Ciucci A, Orecchia A, Lacal PM, et al. Increased melanoma growth and metastasis spreading in mice overexpressing placenta growth factor. *Am J Pathol* 2006; 169: 643-654.
122. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003; 9: 936-943.
123. Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Rockl W, Waltenberger J, et al. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem* 1996; 271: 17629-17634.
124. Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T, et al. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* 2001; 97: 785-791.
125. Landgren E, Schiller P, Cao Y, Claesson-Welsh L. Placenta growth factor stimulates MAP kinase and mitogenicity but not phospholipase C-gamma and migration of endothelial cells expressing Flt 1. *Oncogene* 1998; 16: 359-367.
126. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis* 2006; 9: 225-230; discussion 231.
127. Huang XX, McCaughan GW, Shackel NA, Gorrell MD. Up-regulation of proliferative genes and the ligand/receptor pair placental growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 1 in hepatitis C cirrhosis. *Liver Int* 2007; 27: 960-968.
128. Vanheule E, Fan YD, Van Huysse J, Meester D, Olievier K, Praet M, et al. Expression of placental growth factor in regenerating livers after partial hepatectomy in the rat. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23: 66-75.
129. Frysz-Naglak D, Fryc B, Klimacka-Nawrot E, Mazurek U, Suchecka W, Kajor M, et al. Expression, localization and systemic concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in patients with ulcerative colitis. *Int Immunopharmacol* 2011; 11: 220-225.
130. Eriksson A, Cao R, Pawliuk R, Berg SM, Tsang M, Zhou D, et al. Placenta growth factor-1 antagonizes VEGF-induced angiogenesis and tumor growth by the formation of functionally inactive PlGF-1/VEGF heterodimers. *Cancer Cell* 2002; 1: 99-108.
131. Xu L, Cochran DM, Tong RT, Winkler F, Kashiwagi S, Jain RK, et al. Placenta growth factor overexpression inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis by depleting vascular endothelial growth factor homodimers in orthotopic mouse models. *Cancer Res* 2006; 66: 3971-3977.
132. Schomber T, Kopfstein L, Djonov V, Albrecht I, Baeriswyl V, Strittmatter K, et al. Placental growth factor-1 attenuates vascular endothelial growth factor-A-dependent tumor angiogenesis during beta cell carcinogenesis. *Cancer Res* 2007; 67: 10840-10848.

133. DiSalvo J, Bayne ML, Conn G, Kwok PW, Trivedi PG, Soderman DD, et al. Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor.placenta growth factor heterodimer. *J Biol Chem* 1995; 270: 7717-7723.
134. Cao Y, Linden P, Shima D, Browne F, Folkman J. In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. *J Clin Invest* 1996; 98: 2507-2511.
135. Cao Y, Chen H, Zhou L, Chiang MK, Anand-Apte B, Weatherbee JA, et al. Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. Endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 1996; 271: 3154-3162.
136. Hindryckx P, Waeytens A, Laukens D, Peeters H, Van Huysse J, Ferdinande L, et al. Absence of placental growth factor blocks dextran sodium sulfate-induced colonic mucosal angiogenesis, increases mucosal hypoxia and aggravates acute colonic injury. *Lab Invest* 2010; 90: 566-576.
137. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, et al. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 1990; 172: 1535-1545.
138. Dales JP, Garcia S, Bonnier P, Duffaud F, Carpentier S, Djemli A, et al. [Prognostic significance of VEGF receptors, VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (KDR/Flk-1) in breast carcinoma]. *Ann Pathol* 2003; 23: 297-305.
139. Millauer B, Witzigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993; 72: 835-846.
140. Zhang W, Ran S, Sambade M, Huang X, Thorpe PE. A monoclonal antibody that blocks VEGF binding to VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibits vascular expression of Flk-1 and tumor growth in an orthotopic human breast cancer model. *Angiogenesis* 2002; 5: 35-44.
141. Hyder SM, Murthy L, Stancel GM. Progestin regulation of vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58: 392-395.
142. Kranz A, Mattfeldt T, Waltenberger J. Molecular mediators of tumor angiogenesis: enhanced expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor KDR in primary breast cancer. *Int J Cancer* 1999; 84: 293-298.
143. Nakopoulou L, Stefanaki K, Panayotopoulou E, Giannopoulou I, Athanassiadou P, Gakiopoulou-Givalou H, et al. Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-2/Flk-1 in breast carcinomas: correlation with proliferation. *Hum Pathol* 2002; 33: 863-870.
144. Ryden L, Linderholm B, Nielsen NH, Emdin S, Jonsson PE, Landberg G. Tumor specific VEGF-A and VEGFR2/KDR protein are co-expressed in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 82: 147-154.
145. Pajusola K, Aprelikova O, Pelicci G, Weich H, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Signalling properties of FLT4, a proteolytically processed receptor tyrosine kinase related to two VEGF receptors. *Oncogene* 1994; 9: 3545-3555.
146. Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 604-617.
147. Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Aonuma M, Shibuya M. Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth Differ* 1996; 7: 213-221.
148. Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, et al. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 11709-11714.
149. Kubo H, Cao R, Brakenhielm E, Makinen T, Cao Y, Alitalo K. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor-3 signaling inhibits fibroblast growth factor-2-induced lymphangiogenesis in mouse cornea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 8868-8873.

150. Partanen TA, Arola J, Saaristo A, Jussila L, Ora A, Miettinen M, et al. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *FASEB J* 2000; 14: 2087-2096.
151. Partanen TA, Alitalo K, Miettinen M. Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors. *Cancer* 1999; 86: 2406-2412.
152. Valtola R, Salven P, Heikkilä P, Taipale J, Joensuu H, Rehn M, et al. VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J Pathol* 1999; 154: 1381-1390.
153. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Yang Q, Imabun S, Nakahara M, et al. Flt-4-positive vessel density correlates with vascular endothelial growth factor-d expression, nodal status, and prognosis in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5313-5317.
154. Sarli G, Sassi F, Brunetti B, Rizzo A, Diracca L, Benazzi C. Lymphatic vessels assessment in feline mammary tumours. *BMC Cancer* 2007; 7: 7.
155. Paavonen K, Puolakkainen P, Jussila L, Jähkola T, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am J Pathol* 2000; 156: 1499-1504.
156. Ran S, Volk L, Hall K, Flister MJ. Lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer. *Pathophysiology* 2010; 17: 229-251.
157. Chen YN, Gu Y. [Vascular endothelial growth factor (VEGF)-D in association with VEGF receptor-3 in lymphatic metastasis of breast cancer]. *Ai Zheng* 2009; 28: 1337-1343.
158. Flister MJ, Wilber A, Hall KL, Iwata C, Miyazono K, Nisato RE, et al. Inflammation induces lymphangiogenesis through up-regulation of VEGFR-3 mediated by NF-kappaB and Prox1. *Blood* 2010; 115: 418-429.
159. de la Torre NG, Buley I, Wass JA, Turner HE. Angiogenesis and lymphangiogenesis in thyroid proliferative lesions: relationship to type and tumour behaviour. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 931-944.
160. Zhang QH, Qian K, Li XJ, Pu J, Wu XT. [Experimental study of the hepatocyte growth factor contributing to lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in gastric cancer]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* 2007; 10: 212-216.
161. Lohela M, Helotera H, Haiko P, Dumont DJ, Alitalo K. Transgenic induction of vascular endothelial growth factor-C is strongly angiogenic in mouse embryos but leads to persistent lymphatic hyperplasia in adult tissues. *Am J Pathol* 2008; 173: 1891-1901.
162. Onimaru M, Yonemitsu Y, Fujii T, Tani M, Nakano T, Nakagawa K, et al. VEGF-C regulates lymphangiogenesis and capillary stability by regulation of PDGF-B. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297: H1685-1696.
163. Lahdenranta J, Hagendoorn J, Padera TP, Hoshida T, Nelson G, Kashiwagi S, et al. Endothelial nitric oxide synthase mediates lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res* 2009; 69: 2801-2808.
164. Guo R, Zhou Q, Proulx ST, Wood R, Ji RC, Ritchlin CT, et al. Inhibition of lymphangiogenesis and lymphatic drainage via vascular endothelial growth factor receptor 3 blockade increases the severity of inflammation in a mouse model of chronic inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 2666-2676.
165. Eklund L, Olsen BR. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp Cell Res* 2006; 312: 630-641.
166. Fiedler U, Krissl T, Koidl S, Weiss C, Kobizek T, Deutsch U, et al. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 share the same binding domains in the Tie-2 receptor involving the first Ig-like loop and the epidermal growth factor-like repeats. *J Biol Chem* 2003; 278: 1721-1727.
167. Wong AL, Haroon ZA, Werner S, Dewhirst MW, Greenberg CS, Peters KG. Tie2 expression and phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res* 1997; 81: 567-574.

168. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996; 87: 1161-1169.
169. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277: 55-60.
170. Brindle NP, Saharinen P, Alitalo K. Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. *Circ Res* 2006; 98: 1014-1023.
171. Fam NP, Verma S, Kutryk M, Stewart DJ. Clinician guide to angiogenesis. *Circulation* 2003; 108: 2613-2618.
172. Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J, et al. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell* 2002; 3: 411-423.
173. Linares PM, Chaparro M, Gisbert JP. Angiopoietins in inflammation and their implication in the development of inflammatory bowel disease. A review. *J Crohns Colitis* 2014; 8: 183-190.
174. Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 165-177.
175. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996; 87: 1171-1180.
176. Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, et al. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1999; 286: 2511-2514.
177. Lee HJ, Cho CH, Hwang SJ, Choi HH, Kim KT, Ahn SY, et al. Biological characterization of angiopoietin-3 and angiopoietin-4. *FASEB J* 2004; 18: 1200-1208.
178. Tsigkos S, Koutsilieris M, Papapetropoulos A. Angiopoietins in angiogenesis and beyond. *Expert Opin Investig Drugs* 2003; 12: 933-941.
179. Sundberg C, Kowanetz M, Brown LF, Detmar M, Dvorak HF. Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo. *Lab Invest* 2002; 82: 387-401.
180. London NR, Whitehead KJ, Li DY. Endogenous endothelial cell signaling systems maintain vascular stability. *Angiogenesis* 2009; 12: 149-158.
181. Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, et al. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med* 2006; 12: 235-239.
182. Kim I, Kim JH, Moon SO, Kwak HJ, Kim NG, Koh GY. Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *Oncogene* 2000; 19: 4549-4552.
183. Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 11205-11210.
184. Oshima Y, Oshima S, Nambu H, Kachi S, Takahashi K, Umeda N, et al. Different effects of angiopoietin-2 in different vascular beds: new vessels are most sensitive. *FASEB J* 2005; 19: 963-965.
185. Roviezzo F, Tsigkos S, Kotanidou A, Bucci M, Brancialeone V, Cirino G, et al. Angiopoietin-2 causes inflammation in vivo by promoting vascular leakage. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 738-744.
186. Scharpfenecker M, Fiedler U, Reiss Y, Augustin HG. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *J Cell Sci* 2005; 118: 771-780.



187. Simoes DC, Vassilakopoulos T, Toumpanakis D, Petrochilou K, Roussos C, Papapetropoulos A. Angiopoietin-1 protects against airway inflammation and hyperreactivity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 1314-1321.
188. Lee KS, Lee KY, Kim SR, Park HS, Park SJ, Min KH, et al. Blockade of airway inflammation and hyper-responsiveness by an angiopoietin-1 variant, COMP-Ang1. *Exp Mol Med* 2007; 39: 733-745.
189. Pizurki L, Zhou Z, Glynos K, Roussos C, Papapetropoulos A. Angiopoietin-1 inhibits endothelial permeability, neutrophil adherence and IL-8 production. *Br J Pharmacol* 2003; 139: 329-336.
190. Neagoe PE, Brkovic A, Hajjar F, Sirois MG. Expression and release of angiopoietin-1 from human neutrophils: intracellular mechanisms. *Growth Factors* 2009; 27: 335-344.
191. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997; 277: 48-50.
192. Jones N, Iljin K, Dumont DJ, Alitalo K. Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 257-267.
193. Dallabrida SM, Ismail NS, Pravda EA, Parodi EM, Dickie R, Durand EM, et al. Integrin binding angiopoietin-1 monomers reduce cardiac hypertrophy. *FASEB J* 2008; 22: 3010-3023.
194. Weber CC, Cai H, Ehrbar M, Kubota H, Martiny-Baron G, Weber W, et al. Effects of protein and gene transfer of the angiopoietin-1 fibrinogen-like receptor-binding domain on endothelial and vessel organization. *J Biol Chem* 2005; 280: 22445-22453.
195. Yacyshyn OK, Lai PF, Forse K, Teichert-Kuliszewska K, Jurasz P, Stewart DJ. Tyrosine phosphatase beta regulates angiopoietin-Tie2 signaling in human endothelial cells. *Angiogenesis* 2009; 12: 25-33.
196. Fiedler U, Augustin HG. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol* 2006; 27: 552-558.
197. Nilsson I, Shibuya M, Wennstrom S. Differential activation of vascular genes by hypoxia in primary endothelial cells. *Exp Cell Res* 2004; 299: 476-485.
198. Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999; 18: 5356-5362.
199. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006; 441: 437-443.
200. Boussat S, Eddahibi S, Coste A, Fataccioli V, Gouge M, Housset B, et al. Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in human pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: L371-378.
201. Park JH, Park KJ, Kim YS, Sheen SS, Lee KS, Lee HN, et al. Serum angiopoietin-2 as a clinical marker for lung cancer. *Chest* 2007; 132: 200-206.
202. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003; 9: 685-693.
203. Chen JX, Zeng H, Reese J, Aschner JL, Meyrick B. Overexpression of angiopoietin-2 impairs myocardial angiogenesis and exacerbates cardiac fibrosis in the diabetic db/db mouse model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; 302(4):H1003-12.
204. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9: 653-660.
205. Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, Hegen A, Grunow V, Schmidt JM, et al. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood* 2004; 103: 4150-4156.
206. Mochizuki Y, Nakamura T, Kanetake H, Kanda S. Angiopoietin 2 stimulates migration and tube-like structure formation of murine brain capillary endothelial cells through c-Fes and c-Fyn. *J Cell Sci* 2002; 115: 175-183.
207. Teichert-Kuliszewska K, Maisonnier PC, Jones N, Campbell AI, Master Z, Bendeck MP, et al. Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 659-670.

208. Daly C, Pasnikowski E, Burova E, Wong V, Aldrich TH, Griffiths J, et al. Angiopoietin-2 functions as an autocrine protective factor in stressed endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 15491-15496.
209. Yuan HT, Khankin EV, Karumanchi SA, Parikh SM. Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 2011-2022.
210. Makinde TO, Agrawal DK. Increased expression of angiopoietins and Tie2 in the lungs of chronic asthmatic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010; 44: 384-393.
211. Koutroubakis IE, Xidakis C, Karmiris K, Sfiridaki A, Kandidaki E, Kouroumalis EA. Potential role of soluble angiopoietin-2 and Tie-2 in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Invest* 2006; 36: 127-132.
212. Yoshizaki A, Nakayama T, Naito S, Sekine I. Expression patterns of angiopoietin-1, -2, and tie-2 receptor in ulcerative colitis support involvement of the angiopoietin/tie pathway in the progression of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 2094-2099.
213. Oikonomou KA, Kapsoritakis AN, Kapsoritaki AI, Manolakis AC, Tiaka EK, Tsiopoulos FD, et al. Angiogenin, angiopoietin-1, angiopoietin-2, and endostatin serum levels in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 17: 963-970.
214. Martin JW, Mousa SS, Shaker O, Mousa SA. The multiple faces of nicotine and its implications in tissue and wound repair. *Exp Dermatol* 2009; 18: 497-505.
215. Wu WK, Cho CH. The pharmacological actions of nicotine on the gastrointestinal tract. *J Pharmacol Sci* 2004; 94: 348-358.
216. Koutroubakis IE, Xidakis C, Karmiris K, Sfiridaki A, Kandidaki E, Kouroumalis EA. Serum angiogenin in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1758-1762.
217. Pousa ID, Algaba A, Linares PM, Sanz-Cameno P, Mate J, Moreno-Otero R, et al. Corticosteroids modulate angiogenic soluble factors in ulcerative colitis patients. *Dig Dis Sci* 2010; 56: 871-879.
218. Beck PL, Podolsky DK. Growth factors in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 1999; 5: 44-60.
219. Fogt F, Pascha TL, Zhang PJ, Gausas RE, Rahemtulla A, Zimmerman RL. Proliferation of D2-40-expressing intestinal lymphatic vessels in the lamina propria in inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med* 2004; 13: 211-214.
220. Kaiserling E, Krober S, Geleff S. Lymphatic vessels in the colonic mucosa in ulcerative colitis. *Lymphology* 2003; 36: 52-61.
221. Rahier JF, De Beauce S, Dubuquoy L, Erdual E, Colombel JF, Jouret-Mourin A, et al. Increased lymphatic vessel density and lymphangiogenesis in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34: 533-543.
222. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006; 55: 749-753.
223. Best WR, Beckett JM, Singleton JW. Rederived values of the eight coefficients of the Crohn's Disease Activity Index (CDAI). *Gastroenterology* 1979; 77: 843-846.
224. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med* 1987; 317: 1625-1629.
225. D'Haens G, Geboes K, Ponette E, Penninckx F, Rutgeerts P. Healing of severe recurrent ileitis with azathioprine therapy in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997; 112: 1475-1481.
226. Riley SA, Mani V, Goodman MJ, Herd ME, Dutt S, Turnberg LA. Comparison of delayed release 5 aminosalicylic acid (mesalazine) and sulphasalazine in the treatment of mild to moderate ulcerative colitis relapse. *Gut* 1988; 29: 669-674.
227. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 1996; 87: 1-13.
228. Nishio Y, Kashiwagi A, Takahara N, Hidaka H, Kikkawa R. Cilostazol, a cAMP phosphodiesterase inhibitor, attenuates the production of monocyte chemoattractant

- protein-1 in response to tumor necrosis factor-alpha in vascular endothelial cells. *Horm Metab Res* 1997; 29: 491-495.
229. Evangelou E, Kyzas PA, Trikalinos TA. Comparison of the diagnostic accuracy of lymphatic endothelium markers: Bayesian approach. *Mod Pathol* 2005; 18: 1490-1497.
230. Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 2006; 54: 385-395.
231. Kahn HJ, Bailey D, Marks A. Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi's sarcoma and a subset of angiosarcomas. *Mod Pathol* 2002; 15: 434-440.
232. Hiyama S, Iijima H, Shinzaki S, Mukai A, Inoue T, Shiraishi E, et al. Narrow band imaging with magnifying endoscopy for Peyer's patches in patients with inflammatory bowel disease. *Digestion* 2013; 87: 269-280.
233. Alkim C, Savas B, Ensari A, Alkim H, Dagli U, Parlak E, et al. Expression of p53, VEGF, microvessel density, and cyclin-D1 in noncancerous tissue of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1979-1984.
234. Tsiolakidou G, Koutroubakis IE, Tzardi M, Kouroumalis EA. Increased expression of VEGF and CD146 in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 2008; 40: 673-679.
235. Zurawski J, Wozniak A, Salwa-Zurawska W, Kaczmarek E, Majewski P. Vascular changes in ulcerative colitis and Lesniowski-Crohn's disease. *Pol J Pathol* 2007; 58: 13-21.
236. Seidelin JB, Vainer B, Horn T, Nielsen OH. Circulating L-selectin levels and endothelial CD34 expression in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 1854-1859.
237. Khalil PN, Weiler V, Nelson PJ, Khalil MN, Moosmann S, Mutschler WE, et al. Nonmyeloablative stem cell therapy enhances microcirculation and tissue regeneration in murine inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2007; 132: 944-954.
238. Romano M, Cuomo A, Tuccillo C, Salerno R, Rocco A, Staibano S, et al. Vascular endothelial growth factor and cyclooxygenase-2 are overexpressed in ileal pouch-anal anastomosis. *Dis Colon Rectum* 2007; 50: 650-659.
239. Manetti M, Rosa I, Messerini L, Ibba-Manneschi L. Telocytes are reduced during fibrotic remodelling of the colonic wall in ulcerative colitis. *J Cell Mol Med* 2015; 19: 62-73.
240. Maltby S, Wohlfarth C, Gold M, Zbytunik L, Hughes MR, McNagny KM. CD34 is required for infiltration of eosinophils into the colon and pathology associated with DSS-induced ulcerative colitis. *Am J Pathol* 2010; 177: 1244-1254.
241. Geleff S, Schoppmann SF, Oberhuber G. Increase in podoplanin-expressing intestinal lymphatic vessels in inflammatory bowel disease. *Virchows Arch* 2003; 442: 231-237.
242. Rahier JF, Dubuquoy L, Colombel JF, Jouret-Mourin A, Delos M, Ferrante M, et al. Decreased lymphatic vessel density is associated with postoperative endoscopic recurrence in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19: 2084-2090.
243. Knod L, Donovan EC, Chernoguz A, Crawford KM, Dusing MR, Frischer JS. Vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibition in experimental murine colitis. *J Surg Res* 2013; 184: 101-107.
244. Koda Y, Katanasaka Y, Kitamura Y, Tsuda H, Nishio K, Tamura T, et al. Sunitinib inhibits lymphatic endothelial cell functions and lymph node metastasis in a breast cancer model through inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 3. *Breast Cancer Res* 2011; 13: R66.
245. Jurisic G, Sundberg JP, Detmar M. Blockade of VEGF receptor-3 aggravates inflammatory bowel disease and lymphatic vessel enlargement. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19: 1983-1989.

246. von der Weid PY, Rainey KJ. Review article: lymphatic system and associated adipose tissue in the development of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 32: 697-711.
247. Van Kruiningen HJ, Hayes AW, Colombel JF. Granulomas obstruct lymphatics in all layers of the intestine in Crohn's disease. *APMIS* 2014; 122: 1125-1129.
248. Tonelli F, Giudici F, Liscia G. Is lymphatic status related to regression of inflammation in Crohn's disease? *World J Gastrointest Surg* 2012; 4: 228-233.
249. Algaba A, Linares PM, Fernandez-Contreras ME, Ordonez A, Trapaga J, Guerra I, et al. Relationship between levels of angiogenic and lymphangiogenic factors and the endoscopic, histological and clinical activity, and acute-phase reactants in patients with inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2013; 7: e569-79.
250. Shimoda H, Takahashi Y, Kato S. Regrowth of lymphatic vessels following transection of the muscle coat in the rat small intestine. *Cell Tissue Res* 2004; 316: 325-338.
251. Isidro RA, Bonilla FJ, Pagan H, Cruz ML, Lopez P, Godoy L, et al. The Probiotic Mixture VSL#3 Alters the Morphology and Secretion Profile of Both Polarized and Unpolarized Human Macrophages in a Polarization-Dependent Manner. *J Clin Cell Immunol* 2014; 5: 1000227.
252. D'Alessio S, Correale C, Tacconi C, Gandelli A, Pietrogrande G, Vetrano S, et al. VEGF-C-dependent stimulation of lymphatic function ameliorates experimental inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2014; 124: 3863-3878.
253. Donato G, Conforti F, Allegra E. A rare case of primary nodal hemangioendothelioma. *Oncol Lett* 2013; 6: 1759-1761.
254. Li LR, Fang YJ, Pan ZZ, Wu XJ, Wan DS, Hardingham JE, et al. Length of lymphangiogenesis in the rectal tissues distal to rectal cancer. *Tumour Biol* 2010; 31: 667-671.
255. Jayasinghe C, Simiantonaki N, Michel-Schmidt R, Kirkpatrick CJ. Endothelial VEGFR-3 expression in colorectal carcinomas is associated with hematogenous metastasis. *Oncol Rep* 2009; 22: 1093-1100.
256. Hokari R, Kitagawa N, Watanabe C, Komoto S, Kurihara C, Okada Y, et al. Changes in regulatory molecules for lymphangiogenesis in intestinal lymphangiectasia with enteric protein loss. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: e88-95.
257. Duxbury MS, Grikscheit TC, Gardner-Thorpe J, Rocha FG, Ito H, Perez A, et al. Lymphangiogenesis in tissue-engineered small intestine. *Transplantation* 2004; 77: 1162-1166.
258. Huang HY, Ho CC, Huang PH, Hsu SM. Co-expression of VEGF-C and its receptors, VEGFR-2 and VEGFR-3, in endothelial cells of lymphangioma. Implication in autocrine or paracrine regulation of lymphangioma. *Lab Invest* 2001; 81: 1729-1734.
259. Goldman J, Rutkowski JM, Shields JD, Pasquier MC, Cui Y, Schmokel HG, et al. Cooperative and redundant roles of VEGFR-2 and VEGFR-3 signaling in adult lymphangiogenesis. *FASEB J* 2007; 21: 1003-1012.
260. Pavlakovic H, Becker J, Albuquerque R, Wilting J, Ambati J. Soluble VEGFR-2: an antilymphangiogenic variant of VEGF receptors. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1207 Suppl 1: E7-15.
261. Kopanakis N, Saiti A, D'Avgerinos E, Masselou K, Simiri M, Mandaraka A, et al. Serum VEGF and bFGF in patients with inflammatory bowel diseases. *Ann Ital Chir* 2014; 85: 203-206.
262. Kumara HM, Tohme ST, Kim IY, Kim DG, Kalady MF, Luchtefeld M, et al. Minimally invasive colorectal resection is associated with a transient increase in plasma hepatocyte growth factor levels early after surgery for colon cancer. *Surg Innov* 2011; 18: 254-258.
263. Algaba A, Linares PM, Fernández-Contreras ME, Ordoñez A, Trápaga J, Guerra I, et al. Relationship between histological activity of inflammatory bowel disease (IBD) and angiogenic and lymphangiogenic factors (ALF). *Journal of Crohn's and Colitis* 2012; 6: S31.

## **IX. ANEXO**

---



# Role of Growth Factors in the Development of Lymphangiogenesis Driven by Inflammatory Bowel Disease: A Review

Pablo M. Linares, MSc and Javier P. Gisbert, MD, PhD

Studies on angiogenesis and lymphangiogenesis have gained special relevance in research into factors potentially influencing the pathogenesis and course of inflammatory bowel disease (IBD). The results of the few existing studies on the distribution and density of lymphatic vessels and blood vessels in the context of IBD are controversial. Studies using the specific lymphatic marker podoplanin have revealed a significantly large number of lymphatic vessels in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease (compared to patients with normal mucosa), whereas other authors have found no significant differences. However, the role of vascular endothelial growth factor (VEGF) tyrosine-kinase receptor 3 (VEGFR-3) in the onset of IBD has not been analyzed. In recent years new biochemical, molecular, and immunohistochemical studies indicate that several families of growth factors, such as the VEGF family and their receptors, fibroblast growth factor-2, platelet-derived growth factor-BB, hepatocyte growth factor, the angiotensin system, and integrins may play an important role in the onset of IBD. To date, no comparative studies have analyzed these growth factors and specific lymphatic markers. We examine how growth factors are involved in the development of pathological lymphangiogenesis in patients with IBD and determine whether they play a crucial role in disease exacerbation.

(*Inflamm Bowel Dis* 2011;17:1814–1821)

**Key Words:** lymphangiogenesis, lymphangiogenic factors, growth factors, Crohn's disease, ulcerative colitis, inflammatory bowel disease

The lymphatic system is a blind-ended network consisting of thin-walled lymphatic capillaries, collecting vessels, and specialized secondary immune organs, including lymph nodes, the tonsils, Peyer's patches, and the spleen.

Lymphatic vessels drain protein-rich interstitial fluids and immune cells from tissues through the lymph nodes and return fluids back to circulation at the thoracic duct. These vessels play a key role in tissue homeostasis. After entering the lymph nodes, antigen-presenting cells such as dendritic cells can activate B- and T-cell immune responses. Lymphatic capillaries are lined by loosely associated endothelial cells with no pericyte layer or vascular smooth muscle. This structure allows ready passage of immune cells and tumor cells into the lymphatic system.<sup>1</sup>

## LYMPHATIC VESSELS IN THE BOWEL

Inflammatory bowel disease (IBD) is a complex biologic process involving both immune and nonimmune cells, the microvasculature, and its endothelial lining. Growing evidence suggests that the microvasculature plays a vital role in the pathophysiology of IBD. It contributes to chronic inflammation through altered leukocyte recruitment, impaired perfusion, angiogenesis, and lymphangiogenesis leading to tissue remodeling.<sup>2–4</sup>

Recent findings increasingly suggest that IBD is the result of dysfunctional immunoregulation that manifests as inappropriate production of mucosal cytokines. The reciprocal reaction of some of these cytokines may contribute to angiogenesis and lymphangiogenesis in IBD by inducing intestinal ischemia through vasoconstriction.<sup>5</sup> These diverse areas of IBD microvascular biology represent therapeutic targets that are currently undergoing investigation.<sup>2</sup>

In the intestinal tract, lymphatic vessels are found in the muscularis mucosae and are believed to be absent in the rest of the normal colonic mucosa above the level of the muscularis mucosae.<sup>6</sup> However, lymphatic vessels are sometimes identifiable within the lamina propria of the colon in pathologic states, including intramucosal carcinoma. This "aberrant" lymphangiogenesis seems to be driven by inflammation and/or neoplasia.<sup>6,7</sup>

Several endothelial growth factors induce the growth of new blood vessels and lymphatic vessels. However, a systematic comparative study of the impact of these factors on vascular morphology and function in IBD has not yet been conducted.

Received for publication September 29, 2010; Accepted October 4, 2010.

From the Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Universitario La Princesa and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Madrid, Spain.

Reprints: Pablo M. Linares, MSc, C/ Río águeda n°: 6, 28023 Madrid, Spain. (e-mail: pablus@hotmail.com)

Copyright © 2010 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc.

DOI 10.1002/ibd.21554

Published online 3 December 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

## NOVEL MOLECULAR MARKERS OF LYMPHATIC ENDOTHELIUM

Recently identified specific lymphatic markers have made it possible to study the mechanisms regulating lymphangiogenesis.

### Podoplanin

Podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, is expressed by lymphatic endothelium but not by blood endothelial cells (BECs) or blood vessel endothelium *in vivo* and *in vitro*.<sup>7,8</sup> Its biological function is currently unknown, although *in vitro* studies have indicated that podoplanin may be involved in mediating cell motility by promoting rearrangement of the actin cytoskeleton.<sup>1,9</sup> Human podoplanin is recognized by the D2-40 antibody.<sup>10</sup>

Kenney and Jain<sup>6</sup> used immunostaining with D2-40 to assess the presence of immunopositive lymphatic vessels in sections of normal colon, inflamed colon, hyperplastic polyps, inflammatory polyps, adenomatous polyps, adenomatous polyps containing intramucosal carcinoma, and invasive colonic adenocarcinomas. In most cases of neoplasm and/or inflammation, lymphatic vessels were identified within the lamina propria. Additionally, a nonsignificant trend toward higher lymphatic vessel density was observed in cases with increased inflammation. Lymphatic vessels were present within the lamina propria of the colon in pathologic states.

The lymphatic microvessel counts performed by Geleff et al<sup>11</sup> revealed a statistically significant increase in the muscularis mucosae, tunica submucosa, and tunica subserosa in patients with IBD when compared with normal intestine. Numerical differences between samples of patients with Crohn's disease (CD) and patients with ulcerative colitis (UC) were not significant. Lymphatic capillaries were also predominant in areas where fibrosis replaced chronic inflammation.

In a study on the presence of lymphatic vessels in UC, significantly higher numbers of lymph vessels were found in chronic active UC within the lamina propria and submucosa than in normal mucosa. The numbers of lymph vessels in the lamina propria were higher in severe chronic active UC and lower in moderate and minimal residual disease, with minimal architectural disarray. The density of lymphatic vessels in the submucosa was significantly above normal values at all stages of the disease.<sup>12</sup>

Lymphatic vessels have been shown to be most dense in tissue specimens from patients with CD. The median number of lymphatic vessels was significantly higher in both ileal and colic samples than in samples from patients with other inflammatory diseases (including UC) and samples from normal controls. Moreover, in patients with CD diffuse lymphangiectasia was also observed.<sup>13</sup>

These findings suggest that proliferation of lymphatic vessels in IBD may be triggered by chronic inflammation, irre-

spective of disease stage, and that it is maintained in endstage fibrotic disease. In chronic IBD, acute inflammation, architectural disarray, and lymph vessel proliferation are observed within the lamina propria and the submucosa. Nevertheless, when architectural morphology has been restored the integrity of the lamina propria and, consequently, lymph vessel distribution are believed to be restored, although further studies are necessary to confirm these data.<sup>7,12</sup>

### Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 (VEGFR-3)

VEGFR-3, also known as Flt4, was the first lymphatic-specific growth factor receptor identified.<sup>14</sup> VEGFR-3 is a member of the FMS-like tyrosine kinase family and specifically binds VEGF-C and VEGF-D, but not VEGF-A.<sup>1,9</sup> The VEGFR-3 ligands, VEGF-C and VEGF-D, have recently been reported to promote tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis, both of which are inhibited by blocking the VEGFR-3 signaling pathway.<sup>15</sup>

During early embryonic development, VEGFR-3 is expressed both in developing venous and in presumptive lymphatic endothelia. In normal adult tissues, VEGFR-3 expression is largely restricted to the lymphatic endothelium.<sup>14,16</sup> However, VEGFR-3 expression has also been detected on some blood capillaries associated with tumor neovascularization or with wound granulation tissue<sup>17</sup>; therefore, VEGFR-3 alone is not a sufficiently specific marker for lymphatic vessels.<sup>1,9,19</sup>

The molecular mechanisms of inflammation-induced lymphangiogenesis remain largely unknown. Ran et al<sup>1,9,19</sup> suggested that induction of the nuclear factor kappaB (NF- $\kappa$ B) pathway by inflammatory stimuli activates Prox1. This transcription factor is considered the most specific lineage marker for lymphatic endothelium. Both NF- $\kappa$ B and Prox1 activate the VEGFR-3 promoter, leading to increased receptor expression in lymphatic endothelial cells in breast cancer.<sup>20</sup> This in turn enhances the responsiveness of pre-existing lymphatic endothelium to the VEGFR-3 binding factors, VEGF-C and VEGF-D, ultimately resulting in robust lymphangiogenesis.<sup>21</sup> Lymphangiogenesis and increased VEGF-C expression have been observed in breast cancer, as well as in thyroid and gastric cancer.<sup>22,23</sup>

Lohela et al<sup>24</sup> demonstrated that blood vessels can undergo VEGF-C-induced angiogenesis, even after downregulation of VEGFR-3 in mouse embryos; however, transient VEGF-C expression in adults can induce long-lasting lymphatic hyperplasia with no obvious side effects on blood vasculature. Moreover, VEGF-C is a critical mediator, not only for lymphangiogenesis, but also for capillary stabilization during neovascularization in mice.<sup>25</sup>

Nitric oxide synthase has been shown to mediate VEGF-C-induced lymphangiogenesis in a number of human tumors and, consequently, plays a critical role in lymphatic



metastasis. Stimulation of VEGFR-2 and VEGFR-3 activates endothelial nitric oxide synthase in lymphatic endothelial cells, and nitric oxide donors induce proliferation and/or survival of cultured lymphatic endothelial cells in a dose-dependent manner.<sup>26</sup>

VEGF-D, a ligand for both VEGF receptor-3 (VEGFR-3/Flt-4) and receptor-2 (VEGFR-2/KDR), has also been found to be involved in the development of lymphatic vessels and in the promotion of lymphatic metastases.<sup>27</sup>

### VEGFR-3 Function in IBD

The role of VEGFR-3 in the onset of IBD has not been analyzed, although several studies on its existence in colonic tissue have been performed. White et al<sup>27</sup> assessed the expression of VEGF-D and VEGFR-3 in relation to microvessel density in colorectal carcinomas and adenomas and adjacent normal tissue using immunohistochemistry. VEGF-D was detected in malignant and benign epithelium and in various areas of colorectal smooth muscle. VEGFR-3 expression has been shown to be an independent prognostic indicator in colorectal carcinomas.<sup>27</sup> Inhibition of lymphangiogenesis and lymphatic drainage via VEGFR-3 increased the severity of inflammation in a mouse model of chronic inflammatory arthritis, an autoimmune disease similar in some respects to IBD.<sup>28</sup>

### LYMPHANGIOGENIC GROWTH FACTORS IN IBD

Several families of growth factors may play an important role in IBD, including vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (b-FGF), hepatocyte growth factor (HGF), and platelet-derived growth factor (PDGF). Collectively, these families could determine susceptibility of IBD mucosa to injury and facilitate tissue repair. However, few comparative studies have clarified the role of these markers in lymphangiogenesis in patients with IBD.<sup>29</sup>

### Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A)

The angiogenic cytokine VEGF-A seems to mediate IBD by promoting intestinal angiogenesis and inflammation. The possible contribution of VEGF-A (also known as VEGF or vascular permeability factor) to lymphangiogenesis has been a matter of debate. VEGF-A was discovered in 1983 as the first member of the VEGF family and has been shown to activate the tyrosine kinase receptors VEGFR-1 and VEGFR-2.<sup>30</sup> Recent studies have determined the role of VEGF-A/VEGFR-2 as a signaling pathway in lymphangiogenesis. VEGF-A is a potent inducer of proliferation of lymphatic endothelial cells (LECs) *in vitro*.<sup>8</sup> However, VEGF-A has been shown to stimulate formation of disorganized new vasculature as a result of the fusion of blood capillaries into a mesh, although only a few lymphatic vessels are formed.<sup>31,32</sup> Indirect effects of VEGF-A

(via attraction of inflammatory cells producing VEGF-C and VEGF-D) might also contribute to its lymphangiogenic activity.<sup>33,34</sup> Recent data from a study using the chick embryo chorioallantoic membrane assay as an experimental *in vivo* model showed that VEGF-A and HGF could also influence lymphangiogenesis synergistically. Nevertheless, this observation has not been completely elucidated. The results show that the VEGF-A/HGF combination was able to induce a strong angiogenic response and expression of Prox-1 in the lymphatic endothelial cells of the chorioallantoic membrane.<sup>35</sup>

### Role of VEGF-A in IBD

A number of studies show higher levels of VEGF-A in the serum of patients with IBD than in that of non-IBD controls. The main source of increased VEGF-A serum levels during IBD is controversial, since several authors have demonstrated different possible origins of this cytokine.

Increased tissue and serum levels of VEGF-A have been reported in cases of active IBD, and the proinflammatory effect of this factor is similar to that of other inflammatory agents.<sup>36</sup> VEGF-A may serve as an intermediary between angiogenic stimulation, lymphangiogenic stimulation, and cell-mediated immune responses. The increased levels of VEGF in chronic IBD have also been confirmed by other studies in which significantly higher VEGF serum levels were observed in patients with active CD and UC than in controls.<sup>5,37-40</sup> On the other hand, Kapsoritakis et al<sup>41</sup> reported that plasma VEGF levels were lower and immunostaining intensity weaker in patients with active CD than in healthy controls. In patients with UC, plasma VEGF levels and immunostaining intensity in UC patients were similar to those of healthy controls. This suggests that the course of UC is not VEGF-dependent. Interestingly, Magro et al<sup>42</sup> reported the same results for UC patients, although serum levels of VEGF in CD patients in periods of remission were even lower than those of controls. These dissimilar results in VEGF serum levels do little to clarify the function of VEGF in angiogenesis/lymphangiogenesis during wound repair.

VEGF-A lymphangiogenesis signaling pathway receptor VEGFR-2 has been observed to be increased both in samples from patients with IBD and in mice with DSS-induced colitis<sup>40</sup>; however, Pousa et al<sup>34,39,40</sup> found no differences in VEGFR-2 serum levels between IBD patients and healthy controls.

Peripheral blood mononuclear cells have been described as one of the origins of the elevated VEGF serum levels observed in patients with IBD. Significantly increased VEGF production by peripheral blood mononuclear cells has been found in patients with active CD and in patients with active UC.<sup>43,44</sup>

Although an immunohistochemical study of VEGF in surgical material from patients with active IBD showed no expression,<sup>41</sup> the intestinal mucosa has been considered a possible origin of elevated VEGF serum levels in patients with active IBD.<sup>45</sup> In this respect, Griga et al<sup>46</sup> found increased VEGF expression in the supernatant of cultured mucosal biopsies from patients with active IBD compared to controls.

Hanabata et al<sup>47</sup> also showed that UC patients with low sensitivity to steroids underexpress VEGF or have enlarged microvessels compared to patients with high sensitivity to steroids and normal controls. Therefore, the disruption of the healing process or disturbance of microcirculation may be involved in low sensitivity to steroid therapy in patients with UC.

High levels of VEGF in patients with increased intramural blood flow have also been observed.<sup>48</sup> Overexpression of VEGF has been observed in inflammatory endothelial cells in patients with active IBD, but no change was detected around the vessels in the controls. It has been suggested that the reciprocal reaction of these cytokines may contribute to angiogenesis in IBD by inducing intestinal ischemia through vasoconstriction.<sup>5</sup>

Adipose tissue, which secretes adipocytokines and chemokines/growth factors, was analyzed by Schaffler et al,<sup>49</sup> who concluded that creeping fat represents a characteristic feature of CD and is an important source of VEGF-A secretion. HGF and VEGF from adipose tissue-derived stem cells might accelerate regeneration of injured regions in experimental colitis (TNBS-induced colitis in rats).<sup>50</sup> Beddy et al detected increased VEGF production in fibroblasts isolated from strictures in patients with CD.<sup>51</sup>

VEGF has also been proposed as a possible mediator of inflammation and mucosal permeability in patients with collagenous colitis. These patients have increased colorectal mucosal secretion of VEGF, which may lead to albumin leakage and promote fibrosis with deposition of collagen.<sup>52</sup>

### Fibroblast Growth Factor (b-FGF)

Fibroblast growth factors play an important role in angiogenesis, but their function in lymphangiogenesis remains poorly understood. Shin et al<sup>53</sup> identified FGF receptor (FGFR)-3 as a novel Prox1 target gene. The homeodomain transcription factor Prox1 is essential for the development of the lymphatic system, as it specifies lymphatic endothelial cell fate. The authors also established that FGF-1 and FGF-2 promoted proliferation, migration, and survival of cultured lymphatic endothelial cells without involvement of VEGFR-3. This indicates that FGFR-3 is an initial target of Prox1 during specification of lymphatic cell fate and that the FGF signaling pathway may play an important role in the development of lymphatic vessels.

Cao et al<sup>31</sup> performed a quantitative analysis based on a murine corneal angiogenesis model. b-FGF induced the highest density of blood vessels, although it showed less potent lymphangiogenic activity than VEGF-A and VEGF-C. Increased expression of b-FGF and VEGF-C has been associated with lymphatic metastasis. Furthermore, administration of blocking anti-VEGFR-3 antibodies inhibited b-FGF-induced lymphangiogenesis. These findings show that VEGFR-3 can mediate lymphangiogenesis induced by other growth factors.<sup>15</sup> In addition, FGF-2 knockout mice show significantly less preexisting lymphatic vessels than wildtype controls, suggesting a role for this growth factor in lymphangiogenesis. Nakao et al<sup>54</sup> showed that the physiological expression of lymphatic vessels without blood vessels, which indicates that angiogenesis and lymphangiogenesis—even though intricately related—may occur independently. Chang et al<sup>55</sup> demonstrated that there is dose-dependent response of FGF-2 for lymphatic growth. Little is known about the intracellular mechanism of FGF that leads to cell proliferation. In rat LECs, tumor-derived b-FGF has been shown to exert lymphangiogenic effects through the Akt/mTOR/p70S6 kinase pathway.<sup>56</sup>

### Role of b-FGF in IBD

Serum levels of b-FGF have been found to be significantly higher in patients with active IBD than in controls.<sup>5</sup> Moreover, in CD patients a positive correlation has been found between serum b-FGF and bowel wall thickness. This correlation, together with higher serum b-FGF levels in CD patients with intestinal strictures than in patients with other phenotypes (fistulizing, inflammatory), suggests a possible involvement of b-FGF in the process of transmural fibrogenesis in CD.<sup>48</sup>

A pediatric study from Bousvaros et al<sup>57</sup> showed that, although mean b-FGF levels did not significantly differ between children with CD and other conditions, there was a strong correlation between b-FGF level and disease activity. Thus, while b-FGF is not a specific marker for CD, serum levels reflect disease activity. Release of b-FGF may be important in mediating the angiogenesis, lymphangiogenesis, and wound healing seen in CD.

In patients with UC, the high concentrations of b-FGF in intestinal perfusion fluid reflect either local synthesis or an active secretion within the colonic mucosa. The b-FGF concentration differs according to the location in the intestine and increases significantly with biochemical markers of inflammation and permeability.<sup>58</sup>

### Platelet-derived Growth Factor (PDGF-BB)

In an effort to identify novel lymphangiogenic factors, it has been found that members of the PDGF family, including PDGF-AA, -AB, and -BB, are able to induce

lymphangiogenesis in the mouse cornea. Under physiological conditions, corneal tissue lacks both blood vessels and lymphatic vessels. Thus, all corneal vascular structures induced by PDGFs are newly formed vessels. There is evidence that PDGF-BB is a direct lymphangiogenic factor. In vitro, PDGF-BB stimulates MAP kinase activity and cell motility of isolated lymphatic endothelial cells. In vivo, PDGF-BB is a potent inducer of the growth of lymphatic vessels. Expression of PDGF-BB in murine fibrosarcoma cells has been shown to induce tumor lymphangiogenesis and lead to enhanced metastasis in lymph nodes.<sup>59</sup> Although these experiments were carried out in adult animals, it is possible that the PDGF/PDGFR system and the VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 signaling pathway have overlapping roles in the development of the lymphatic system in early embryos. However, little is known about the associated regulator that determines PDGF-BB expression. Murine models of therapeutic neovascularization have revealed that a typical lymphangiogenic factor, VEGF-C, is an essential regulator determining PDGF-BB expression for vascular stabilization and acts via a paracrine mechanism.<sup>25</sup> Thus, PDGF-BB-induced lymphangiogenesis might be indirectly mediated by activation of the VEGF-C/-D/VEGFR-3 signaling pathway.<sup>60</sup>

### Role of PDGF-BB in IBD

Kumagai et al<sup>61</sup> evaluated serum and plasma pools of PDGF-BB in patients with IBD. They found that IBD was associated with an increase in platelet-stored and circulating PDGF levels, which correlated with clinical, endoscopic, inflammatory, and angiogenic activity of the disease and with IBD-associated oxidative stress. It has been suggested that PDGF is also involved in the active inflammatory phase, possibly as a chemoattractant for mononuclear inflammatory cells; however, very little is known about its function in IBD-driven lymphangiogenesis.<sup>62</sup>

### Hepatocyte Growth Factor (HGF)

HGF is a well-known angiogenesis inducer and promoter in normal and pathologic conditions. Recent data show that HGF could also influence lymphangiogenesis, although this observation has not been completely elucidated.<sup>63</sup>

In a mouse corneal lymphangiogenesis model, HGF induced sprouting and growth of new lymphatic vessels expressing the vessel endothelial specific marker hyaluronan receptor-1 (LYVE-1). HGF-induced lymphangiogenesis can be partially blocked by soluble VEGFR-3, suggesting that HGF may stimulate lymphatic vessel growth through an indirect mechanism. Consistent with this finding, the HGF receptor (HGF-R or c-Met) was found in corneal blood vessels but not in lymphatic vessels in a mouse corneal lymphangiogenesis model.<sup>64</sup> Nevertheless, Zhang et al<sup>23</sup> found overexpression of HGF-R on enlarged vessels of patients

with gastric cancer compared to healthy controls, and showed that microlymphatic density was positively correlated with the expression of HGF in gastric cancer.

A comparative analysis of the genetic expression of purified LEC versus BEC revealed that LEC expressed significantly higher levels of HGF-R. Whereas little or no HGF-R was expressed by lymphatic vessels in normal tissues, HGF-R was strongly expressed by regenerating lymphatic endothelium during tissue repair and by activated lymphatic vessels in inflamed skin. Treatment of cultured LEC with HGF promoted LEC proliferation, migration, and tubule formation. HGF-induced proliferation of LEC did not require VEGFR-3 activation, and HGF-induced cell migration was partially mediated by integrin  $\alpha$ -9. Transgenic or subcutaneous delivery of HGF promoted lymphangiogenesis in mice, whereas systemic blockade of HGF-R inhibited lymphatic function. These results identify HGF as a novel potent lymphangiogenesis factor and indicate that HGF-R might serve as a new target for inhibiting pathological lymphangiogenesis.<sup>65</sup>

### Role of HGF in IBD

Only one clinical study has found high serum levels of HGF in patients with IBD. Evaluation of serum HGF suggests that this may be an epiphenomenon of inflammation. It can also be suggested that HGF mediates angiogenesis, lymphangiogenesis, and vascular permeability in the mucosa of children with IBD.<sup>66</sup>

Ando et al<sup>50</sup> demonstrated that adipose tissue-derived stem cells can accelerate the regeneration of injured regions in experimental colitis (TNBS-induced colitis in rats), in which HGF might be responsible for the regeneration of injured regions in the colon.

Once intestinal mucosal injury occurs, HGF, among other cytokines, is induced in both the intestinal lumen and submucosa, and these factors cooperatively stimulate epithelial mucosal repair. HGF also modulates intestinal epithelial cell proliferation and migration, thus accelerating intestinal mucosal repair. Additionally, the proteolytic activation of HGF, which is mediated by HGF activator, is essential for the regeneration of injured intestinal mucosa.

HGF was first shown to stimulate nonpathologic angiogenesis in an animal model of IBD. Neovascularization was stimulated while the intestinal inflammatory response was being modulated by administration of HGF to the animals.<sup>67</sup> Recently, other authors have shown that the administration of recombinant human HGF or HGF gene therapy diminishes disease severity in animal models of IBD.<sup>68</sup>

### Angiopoietin System (Ang-1, Ang-2, Tie-2)

To date, four members of this family have been identified. The most important are Ang-1 and Ang-2, both of which bind only to the receptor tyrosine kinase Tie-2 and

control blood vessel stabilization signals.<sup>69</sup> Gale et al<sup>70</sup> have studied the role of Tie-2 in endothelial cells extensively over the years, showing this field to be extremely complex. Tie-2 is also expressed on LECs.<sup>71</sup> Ang-2 was initially characterized as an Ang-1 competitive antagonist, since transgenic overexpression of Ang-2 produced angiogenic defects resembling those of Ang-1 or Tie-2 knockout mice.<sup>72</sup> Evidence of condition-dependent agonistic roles for Ang-2 have called into question the initial characterization of Ang-2 as simply a competitive antagonist of Ang-1.<sup>73</sup>

### Angiopoietins in IBD

In a DSS-induced murine colitis model, Ganta et al<sup>74</sup> demonstrated that Ang-2 mediates inflammatory angiogenesis, lymphangiogenesis, and neutrophil infiltration to improve some, but not all, the clinical features of IBD. Median serum Ang-2 and Tie-2 levels have been found to be significantly higher in both UC and CD patients than in healthy controls. CD patients with active disease had significantly higher levels of Ang-2 compared with patients with nonactive disease.<sup>34,39,75</sup> Although these studies do not provide enough evidence of the role of the angiopoietin system in the development of lymphatic vessels in IBD patients, this could show us how angiopoietins are involved in this process.

### Integrins

There is increasing evidence that the role of integrins in lymphangiogenesis is different from the role they play in regulating angiogenesis. Integrin  $\alpha 9 \beta 1$  is required for the development of a fully functional lymphatic system in a murine model.<sup>1</sup> It plays a role in growth factor-mediated lymphangiogenesis as Prox-1, and coordinately upregulates integrin  $\alpha 9 \beta 1$  and VEGFR3 expression and endothelial cell motility in vivo. This integrin has also been shown to promote VEGF-C and D-stimulated cell migration by directly binding these growth factors. Importantly, antagonism of  $\alpha 9 \beta 1$  suppresses VEGF-C-induced motility. The results of these studies indicate that  $\alpha 9 \beta 1$  plays unique yet critical roles in lymphangiogenesis. Other studies have shown that most  $\beta 1$  integrins are expressed on lymphatic vessels. In contrast,  $\alpha v$  integrins appear to play little or no role in lymphangiogenesis.<sup>1</sup>

Integrin  $\alpha 4 \beta 1$  is highly expressed on tumor lymphatic endothelium, and antagonists of this integrin can block lymphangiogenesis and tumor metastasis. VCAM-1, which binds this integrin and members of the  $\beta 2$  integrin family, is typically present on endothelium upon activation (expression induced by inflammatory cytokines) and is involved in the slow rolling of monocytes and lymphocytes during inflammatory cell recruitment. This in turn facilitates the adhesion and infiltration of leukocytes that produce mediators of angiogenesis at the inflammatory site during IBD. Thus, several integrins, in association with ad-

hesion molecules, appear to play an important role in lymphangiogenesis by facilitating inflammation during IBD.<sup>1,76</sup>

### CONCLUSION

The data examined above show that lymphangiogenesis may be differentially regulated by growth factors involved in the pathogenesis of IBD. Most of these factors are also responsible for control of angiogenesis. Thus, the contribution of lymphangiogenesis to the onset of IBD may involve a synergistic model in which sprouting lymphatic vessels could follow the growth of blood capillaries in order to drain extravasated fluid in inflamed mucosa and thus recover tissue homeostasis. Although pathological lymphangiogenesis may contribute to a chronic inflammatory state, its mechanisms are unclear. The contradictory results in studies performed on lymphangiogenic growth factors in IBD do not yet provide enough information to consider them reliable markers of disease progress. Further studies are necessary to establish the role of these factors as alternative therapeutic targets.

### REFERENCES

1. Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:604–617.
2. Hatoum OA, Heidemann J, Binion DG. The intestinal microvasculature as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1072:78–97.
3. Pousa ID, Gisbert JP, Mate J. [Vascular development in inflammatory bowel disease.] *Gastroenterol Hepatol*. 2006;29:414–421.
4. Pousa ID, Mate J, Gisbert JP. Angiogenesis in inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Invest*. 2008;38:73–81.
5. Kanazawa S, Tsunoda T, Onuma E, et al. VEGF, basic-FGF, and TGF-beta in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol*. 2001;96:822–828.
6. Kenney BC, Jain D. Identification of lymphatics within the colonic lamina propria in inflammation and neoplasia using the monoclonal antibody D2-40. *Yale J Biol Med*. 2008;81:103–113.
7. Kaiserling E, Krober S, Geleff S. Lymphatic vessels in the colonic mucosa in ulcerative colitis. *Lymphology*. 2003;36:52–61.
8. Hirakawa S, Hong YK, Harvey N, et al. Identification of vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Am J Pathol*. 2003;162:575–586.
9. Cueni LN, Detmar M. New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease. *J Invest Dermatol*. 2006;126:2167–2177.
10. Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, et al. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol*. 2005;166:913–921.
11. Geleff S, Schoppmann SF, Oberhuber G. Increase in podoplanin-expressing intestinal lymphatic vessels in inflammatory bowel disease. *Virchows Arch*. 2003;442:231–237.
12. Fogt P, Pascha TL, Zhang PJ, et al. Proliferation of D2-40-expressing intestinal lymphatic vessels in the lamina propria in inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med*. 2004;13:211–214.
13. Pedica F, Ligorio C, Tonelli P, et al. Lymphangiogenesis in Crohn's disease: an immunohistochemical study using monoclonal antibody D2-40. *Virchows Arch*. 2008;452:57–63.
14. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic



- endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:3566–3570.
15. Kubo H, Cao R, Brakenhielm E, et al. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor-3 signaling inhibits fibroblast growth factor-2-induced lymphangiogenesis in mouse cornea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:8868–8873.
  16. Partanen TA, Arola J, Saaristo A, et al. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *FASEB J*. 2000;14:2087–2096.
  17. Partanen TA, Alitalo K, Miettinen M. Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors. *Cancer*. 1999;86:2406–2412.
  18. Paavonen K, Puolakkainen P, Jussila L, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am J Pathol*. 2000;156:1499–1504.
  19. Ran S, Volk L, Hall K, et al. Lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer. *Pathophysiology*. 2010;17:229–251.
  20. Chen YN, Gu Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-D in association with VEGF receptor-3 in lymphatic metastasis of breast cancer. *Chin J Cancer*. 2009;28:1337–1343.
  21. Flister MJ, Wilber A, Hall KL, et al. Inflammation induces lymphangiogenesis through up-regulation of VEGFR-3 mediated by NF- $\kappa$ B and Prox1. *Blood*. 2010;115:418–429.
  22. de la Torre NG, Buley I, Wass JA, et al. Angiogenesis and lymphangiogenesis in thyroid proliferative lesions: relationship to type and tumour behaviour. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13:931–944.
  23. Zhang QH, Qian K, Li XJ, et al. [Experimental study of the hepatocyte growth factor contributing to lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in gastric cancer]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*. 2007;10:212–216.
  24. Lohela M, Helotera H, Haiko P, et al. Transgenic induction of vascular endothelial growth factor-C is strongly angiogenic in mouse embryos but leads to persistent lymphatic hyperplasia in adult tissues. *Am J Pathol*. 2008;173:1891–1901.
  25. Onimaru M, Yonemitsu Y, Fujii T, et al. VEGF-C regulates lymphangiogenesis and capillary stability by regulation of PDGF-B. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297:H1685–1696.
  26. Lahdenranta J, Hagendoorn J, Padera TP, et al. Endothelial nitric oxide synthase mediates lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res*. 2009;69:2801–2808.
  27. White JD, Hewett PW, Kosuge D, et al. Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. *Cancer Res*. 2002;62:1669–1675.
  28. Guo R, Zhou Q, Proulx ST, et al. Inhibition of lymphangiogenesis and lymphatic drainage via vascular endothelial growth factor receptor 3 blockade increases the severity of inflammation in a mouse model of chronic inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;60:2666–2676.
  29. Beck PL, Podolsky DK. Growth factors in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 1999;5:44–60.
  30. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983;219:983–985.
  31. Cao R, Eriksson A, Kubo H, et al. Comparative evaluation of FGF-2, VEGF-A-, and VEGF-C-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability. *Circ Res*. 2004;94:664–670.
  32. Pousa ID, Gisbert JP. Gastric angiogenesis and *Helicobacter pylori* infection. *Rev Esp Enferm Dig*. 2006;98:527–541.
  33. Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, et al. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med*. 2005;201:1089–1099.
  34. Pousa ID, Mate J, Salcedo-Mora X, et al. Role of vascular endothelial growth factor and angiopoietin systems in serum of Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14:61–67.
  35. Cimpean AM, Seclaman E, Ceausu R, et al. VEGF-A/HGF induce Prox-1 expression in the chick embryo chorioallantoic membrane lymphatic vasculature. *Clin Exp Med*. 2010;10:169–172.
  36. Goebel S, Huang M, Davis WC, et al. VEGF-A stimulation of leukocyte adhesion to colonic microvascular endothelium: implications for inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290:G648–654.
  37. Griga T, Tromm A, Spranger J, et al. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 1998;33:504–508.
  38. Azzam N. Angiogenesis and inflammatory bowel disease. *Saudi J Gastroenterol*. 2007;13:37–38.
  39. Duenas Pousa I, Mate Jimenez J, Salcedo Mora X, et al. Analysis of soluble angiogenic factors in Crohn's disease: a preliminary study. *Gastroenterol Hepatol*. 2007;30:518–524.
  40. Scaldaferrì F, Vetrano S, Sans M, et al. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology*. 2009;136:585–595 e585.
  41. Kapsoritakis A, Sfiridaki A, Maltezos E, et al. Vascular endothelial growth factor in inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis*. 2003;18:418–422.
  42. Magro F, Araujo F, Pereira P, et al. Soluble selectins, sICAM, sVCAM, and angiogenic proteins in different activity groups of patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 2004;49:1265–1274.
  43. Griga T, Gutzeit A, Sommerkamp C, et al. Increased production of vascular endothelial growth factor by peripheral blood mononuclear cells in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999;11:175–179.
  44. Griga T, Werner S, Koller M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in Crohn's disease: increased production by peripheral blood mononuclear cells and decreased VEGF165 labeling of peripheral CD14<sup>+</sup> monocytes. *Dig Dis Sci*. 1999;44:1196–1201.
  45. Griga T, Voigt E, Gretzer B, et al. Increased production of vascular endothelial growth factor by intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology*. 1999;46:920–923.
  46. Griga T, May B, Pfisterer O, et al. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology*. 2002;49:116–123.
  47. Hanabata N, Sasaki Y, Tanaka M, et al. Vascular endothelial growth factor expression and microvessel parameters of colonic mucosa correlate with sensitivity to steroid in patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*. 2005;40:188–193.
  48. Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Armellini E, et al. Serum bFGF and VEGF correlate respectively with bowel wall thickness and intramural blood flow in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2004;10:573–577.
  49. Schaffler A, Furst A, Buchler C, et al. Vascular endothelial growth factor secretion from mesenteric adipose tissue and from creeping fat in Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006;21:1419–1423.
  50. Ando Y, Inaba M, Sakaguchi Y, et al. Subcutaneous adipose tissue-derived stem cells facilitate colonic mucosal recovery from 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis in rats. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14:826–838.
  51. Beddy D, Watson RW, Fitzpatrick JM, et al. Increased vascular endothelial growth factor production in fibroblasts isolated from strictures in patients with Crohn's disease. *Br J Surg*. 2004;91:72–77.
  52. Taha Y, Raab Y, Larsson A, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)—a possible mediator of inflammation and mucosal permeability in patients with collagenous colitis. *Dig Dis Sci*. 2004;49:109–115.
  53. Shin JW, Min M, Larrieu-Lahargue F, et al. Prox1 promotes lineage-specific expression of fibroblast growth factor (FGF) receptor-3 in lymphatic endothelium: a role for FGF signaling in lymphangiogenesis. *Mol Biol Cell*. 2006;17:576–584.
  54. Nakao S, Maruyama K, Zandi S, et al. Lymphangiogenesis and angiogenesis: concurrence and/or dependence? Studies in inbred mouse strains. *FASEB J*. 2010;24:504–513.
  55. Chang LK, Garcia-Cardena G, Farnebo F, et al. Dose-dependent response of FGF-2 for lymphangiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:11658–11663.
  56. Matsuo M, Yamada S, Koizumi K, et al. Tumour-derived fibroblast growth factor-2 exerts lymphangiogenic effects through Akt/mTOR/p70S6kinase pathway in rat lymphatic endothelial cells. *Eur J Cancer*. 2007;43:1748–1754.
  57. Bousvaros A, Zurakowski D, Fishman SJ, et al. Serum basic fibroblast growth factor in pediatric Crohn's disease. Implications for wound healing. *Dig Dis Sci*. 1997;42:378–386.

58. Thorn M, Raab Y, Larsson A, et al. Intestinal mucosal secretion of basic fibroblast growth factor in patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol.* 2000;35:408–412.
59. Cao R, Bjorndahl MA, Religa P, et al. PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *Cancer Cell.* 2004;6:333–345.
60. Cao Y. Direct role of PDGF-BB in lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cell Cycle.* 2005;4:228–230.
61. Krzystek-Korpacka M, Neubauer K, Matusiewicz M. Platelet-derived growth factor-BB reflects clinical, inflammatory and angiogenic disease activity and oxidative stress in inflammatory bowel disease. *Clin Biochem.* 2009;42:1602–1609.
62. Kumagai S, Ohtani H, Nagai T, et al. Platelet-derived growth factor and its receptors are expressed in areas of both active inflammation and active fibrosis in inflammatory bowel disease. *Tohoku J Exp Med.* 2001;195:21–33.
63. Jiang WG, Davies G, Martin TA, et al. The potential lymphangiogenic effects of hepatocyte growth factor/scatter factor in vitro and in vivo. *Int J Mol Med.* 2005;16:723–728.
64. Cao R, Bjorndahl MA, Gallego MI, et al. Hepatocyte growth factor is a lymphangiogenic factor with an indirect mechanism of action. *Blood.* 2006;107:3531–3536.
65. Kajiya K, Hirakawa S, Ma B, et al. Hepatocyte growth factor promotes lymphatic vessel formation and function. *EMBO J.* 2005;24:2885–2895.
66. Srivastava M, Zurakowski D, Cheifetz P, et al. Elevated serum hepatocyte growth factor in children and young adults with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001;33:548–553.
67. Thatch KA, Mendelson KG, Haber MM, et al. Growth factor manipulation of intestinal angiogenesis: a possible new paradigm in the management of inflammatory bowel disease. *J Surg Res.* 2009;156:245–249.
68. Ido A, Numata M, Kodama M, et al. Mucosal repair and growth factors: recombinant human hepatocyte growth factor as an innovative therapy for inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 2005;40:925–931.
69. Huang Z, Bao SD. Roles of main pro- and anti-angiogenic factors in tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol.* 2004;10:463–470.
70. Gale NW, Thurston G, Hackett SF, et al. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by angiopoietin-1. *Dev Cell.* 2002;3:411–423.
71. Morisada T, Oike Y, Yamada Y, et al. Angiopoietin-1 promotes LYVE-1-positive lymphatic vessel formation. *Blood.* 2005;105:4649–4656.
72. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* 1997;277:55–60.
73. Nguyen VP, Chen SH, Trinh J, et al. Differential response of lymphatic, venous and arterial endothelial cells to angiopoietin-1 and angiopoietin-2. *BMC Cell Biol.* 2007;8:10.
74. Ganta VC, Cromer W, Mills GL, et al. Angiopoietin-2 in experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16:1029–1039.
75. Koutroubakis IE, Xidakis C, Karmiris K, et al. Potential role of soluble angiopoietin-2 and Tie-2 in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Invest.* 2006;36:127–132.
76. Chidlow JH, Jr., Shukla D, Grisham MB, et al. Pathogenic angiogenesis in IBD and experimental colitis: new ideas and therapeutic avenues. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293:G5–G18.



# Relationship between levels of angiogenic and lymphangiogenic factors and the endoscopic, histological and clinical activity, and acute-phase reactants in patients with inflammatory bowel disease

Alicia Algaba <sup>a,\*</sup>, Pablo M. Linares <sup>b</sup>, M. Encarnación Fernández-Contreras <sup>b</sup>, Amparo Ordoñez <sup>c</sup>, Javier Trápaga <sup>c</sup>, Iván Guerra <sup>a</sup>, María Chaparro <sup>b</sup>, Gema de la Poza <sup>a</sup>, Javier P. Gisbert <sup>b</sup>, Fernando Bermejo <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Gastroenterology of the Hospital Universitario de Fuenlabrada, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Hospital Universitario de La Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IP) and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Madrid, Spain

<sup>c</sup> Department of Clinical Biochemistry, Hospital Universitario de Fuenlabrada, Madrid, Spain

Received 15 December 2012; received in revised form 2 April 2013; accepted 4 April 2013

## KEYWORDS

Angiogenesis;  
Angiogenic and  
lymphangiogenic factors;  
Inflammatory bowel  
disease;  
Lymphangiogenesis;  
Vascular endothelial  
growth factor

## Abstract

**Background:** Angiogenic and lymphangiogenic factors (ALFs) may play an important role in inflammatory bowel disease (IBD). Our aims were to evaluate levels of ALFs in serum and the colonic mucosa culture supernatant (MCS) of patients with active and quiescent IBD and healthy subjects and to correlate them with the endoscopic, clinical and histological activity and with acute-phase reactants.

**Methods:** This is a prospective study of 28 controls and 72 IBD patients. Serum and MCS concentration of VEGFA, VEGFC, VEGFD, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PlGF, Ang1, Ang2 and Tie2 were measured by ELISA. Activity was established by specific indexes (CDAI, Mayo score, SES-CD, D'Haens scale and Riley index). Acute-phase reactants were routinely measured.

**Results:** MCS levels of all ALFs except VEGFR3 were higher in patients with endoscopic ( $p < 0.05$ ), clinical ( $p < 0.05$ ) and histological ( $p < 0.01$ ) activity than in those without it. In serum, VEGFA, VEGFC and Ang1 and VEGFA and Ang1 levels were lower in patients in remission than in patients with clinical and histological activity, respectively ( $p < 0.05$ ). There was a correlation between serum and MCS concentrations for VEGFD, VEGFR3, PlGF and Tie2 ( $r = 0.25$ ,  $r = 0.48$ ,  $r = -0.45$  and

\* Corresponding author at: C/Isaac Peral, 43. Bloque D1, 1ºB. 28330, San Martín de la Vega. Madrid, Spain. Tel.: +34 699646717; fax.: +34 916006175.

E-mail address: [alicia\\_algaba@hotmail.com](mailto:alicia_algaba@hotmail.com) (A. Algaba).

$r = 0.36$ ;  $p < 0.05$ ). Ang2 in MCS was the best predictor for the diagnosis of endoscopic, histological and clinical activity (area under ROC curve  $> 0.8$ ).

**Conclusions:** MCS determination suggests a local increase in ALFs that correlates with IBD activity. Although the correlation between ALFs in serum and MCS was not good, the study of some of these factors as possible targets of new drugs for IBD constitutes a key new line of research.

© 2013 European Crohn's and Colitis Organisation. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Angiogenesis is defined as the formation of new blood vessels from pre-existing ones.<sup>1</sup> This process occurs during various physiological processes, e.g., embryogenesis, female reproductive cycle, hair growth cycle, wound healing or tissue growth.<sup>2,3</sup> In physiological angiogenesis, after stabilization and structuralisation of the new formed capillary network, the balance between pro- and anti-angiogenic factors returns to baseline levels and the process ends.<sup>4</sup> However, an imbalance between positive and negative regulators probably leads to pathological angiogenesis which has been suggested to promote diseases such as cancer, ischemic cardiovascular disease, diabetic retinopathy and rheumatoid arthritis.<sup>5,6</sup>

In contrast to blood vessels, lymphatic vessel biology is much less understood. Lymphatic vessels carry out important physiological functions including draining excess body fluid from tissues, intestinal fat absorption and immune cell trafficking through the lymph nodes.<sup>3,7</sup> Several studies have documented the association of lymphangiogenesis with tumour growth and metastatic spread.<sup>8–10</sup>

Inflammatory bowel disease (IBD) includes Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). The etiology of CD or UC has not been fully elucidated. There is growing clinical and experimental evidence suggesting that the initiation and progression of these inflammatory disorders involve complex interactions among genetic, immune and environmental factors.<sup>11–13</sup> Recent findings indicate that angiogenesis and lymphangiogenesis also play a crucial role in IBD.<sup>14–19</sup>

New biochemical, molecular and immunohistochemical studies indicate that several families of growth factors, such as the vascular endothelial growth factor (VEGF) family and their receptors, and the angiopoietin system may play an important role in the onset of IBD. To date, there is a lack of comparative studies analysing these growth factors at a systemic and local level using colonic mucosa culture supernatant (MCS), and levels of these proteins have not been correlated with either the clinical, endoscopic or histological activity of IBD.

The aims of this study were: (i) to evaluate and compare the levels of the main angiogenic and lymphangiogenic factors (ALFs) and their receptors in serum and MCS from patients with active and quiescent IBD and healthy controls, and (ii) to correlate ALF levels with the endoscopic, clinical and histological activity, and with acute-phase reactants (APR) in patients with CD and UC. A complete characterization of angiogenic and lymphangiogenic processes should help to elucidate the pathogenesis of IBD and help to propose lines for future research in this field.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients and controls

A prospective study was carried-out on 28 non-IBD controls and 72 patients with IBD (37 UC and 35 CD) that underwent a colonoscopy by medical criteria at *Hospital Universitario de Fuenlabrada*. IBD was diagnosed by clinical, radiological, endoscopic and histological criteria.<sup>20</sup> IBD location was established in accordance with the Montreal classification.<sup>21</sup> Patients were classified into active or quiescent CD and UC by endoscopic and clinical criteria, as defined below. All participants were asked to sign an informed consent form prior recruitment. The study was approved by the Research Ethics Committee at *Hospital Universitario de Fuenlabrada* and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

### 2.2. Endoscopic activity of IBD

Experienced gastroenterologists performed the ileocolonoscopies and graded the findings according to the Simple Endoscopic Score index for CD (SES-CD) and the endoscopic Mayo subscore for UC.

An SES-CD score between 0 and 2 suggested inactive disease in the colon and terminal ileum, 3–6 mildly active, 7–15 moderately active, and  $> 16$  severely active disease.<sup>22,23</sup>

Regarding UC activity, a Mayo endoscopic subscore of 0 was considered inactive disease, 1 as mild activity, 2 as moderate activity and 3 as severe activity.<sup>24</sup>

### 2.3. Histological activity of IBD

All specimens were subjected to histological examination by an experienced pathologist.

In CD patients, histological activity was graded according to a scale of mucosal alterations developed by D'Haens et al.<sup>25</sup> The total histological score was a sum of the following variables: epithelial damage [normal (score = 0), focal pathology (score = 1) or extensive pathology (score = 2)]; architectural changes [normal (score = 0), moderately disturbed (score = 1) or severely disturbed (score = 2)]; infiltration of the lamina propria by mononuclear polymorphonuclear cells [normal (score = 0), moderate increase (score = 1), severe increase (score = 2)]; polymorphonuclear cells in the epithelium [in surface epithelium (score = 1), cryptitis (score = 2) and crypt abscess (score = 3)]; presence of erosion and/or ulcer and presence of granuloma [both scored as yes (score = 1) or no (score = 0)] and the number of biopsies



affected [none (score = 0), <33% (score = 1) and 33–66% (score = 2)].

Histological findings in UC patients were evaluated by using the Riley Index.<sup>26</sup> Six histological features of UC were considered: acute inflammatory cell infiltrate (polymorphonuclear cells in the lamina propria), crypt abscesses, mucin depletion, surface epithelial integrity, chronic inflammatory cell infiltrate (round cells in the lamina propria), and crypt architectural irregularities. Each feature was graded on a four-point scale from 0 to 3.

## 2.4. Clinical activity of IBD

CD and UC clinical activity were ascertained by Crohn's Disease Activity Index (CDAI) and Mayo Score respectively.<sup>27</sup> A CDAI score below 150 indicated a quiescent disease; 150–250, mild disease; 251–350, moderate disease; and >350, severe disease. A Mayo score  $\leq 2$  was considered disease remission; 3–5, mild disease; 6–10 moderate disease, and a score between 10 and 12 was considered severe disease.

## 2.5. APR

Blood leukocytes (normal range  $4.0\text{--}11.0 \times 10^9/\text{L}$ ), haemoglobin (normal range  $13.0\text{--}17.3 \text{ g/dL}$ ), C-reactive protein (CRP, upper limit of normal  $5 \text{ mg/L}$ ), platelet count (normal range:  $140\text{--}450 \times 10^9/\text{L}$ ) and erythrocyte sedimentation rate (ESR, upper limit of normal  $< 15 \text{ mm/h}$ ) were routinely determined before endoscopy procedures.

## 2.6. Samples and determinations

Three different specimens were obtained per subject:

- Blood samples for ALF measurement in serum: Peripheral blood was collected before colonoscopy in serum separator tubes, allowed to clot for 30 min at room temperature and centrifuged for 15 min at 3500 rpm. Serum was stored at  $-70^\circ\text{C}$  until analysis.
- Tissue samples for ALF determination in MCS: Four colon biopsies were taken from non-affected (controls and non-active IBD patients) and/or affected mucosa (active IBD patients). In patients with active disease, samples from both inflamed and non-inflamed colonic mucosa were also taken when the disease extension was allowed. Biopsies were washed for 3–4 h in Complete Medium (RPMI supplemented with foetal calf serum (10%), HEPES, antibiotics and antifungal mixture) at  $4^\circ\text{C}$  on a shaker. After washing, mucosal specimens were incubated at  $37^\circ\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$  over inserts with  $0.2 \mu\text{m}$  pore size and well plates with Complete Medium. 24 h later, biopsies were weighed and culture supernatants were collected and stored at  $-70^\circ\text{C}$  until ALF determination.
- Biopsies for histological analyses: Samples were obtained from the same area as those for MCS. Tissues were fixed in 4% paraformaldehyde and sent to the Department of Pathology for histological examination.

Vascular endothelial growth factors A, C and D (VEGFA, VEGFC, VEGFD), their receptors 1, 2 and 3 (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), placental growth factor (PlGF), angiopoietins 1 and 2 (Ang1, Ang2) and their receptor (Tie2) levels in serum and MCS were determined by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Human Immunoassay Quantikine, R & D Systems,

Minneapolis, USA) following the manufacturer's directions. Inter- and intra-assay variations and precision were calculated in-house as previously described.<sup>24,25,28,29</sup>

## 2.7. Statistical analysis

Frequencies and percentages were determined for categorical variables. For quantitative variables, data were shown as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). The Kolmogorov–Smirnov test was used to evaluate normality in continuous variables. Comparison between quantitative variables and two groups of categorical variables were made by Student's *t*-test or by the Mann–Whitney *U*-test when normal distribution was not followed. Comparisons between quantitative and qualitative variables with three or more categories were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) test or by non-parametric Kruskal–Wallis test. To analyse the relationship between two quantitative variables, Pearson's and Spearman's correlation coefficients were determined for variables with a Gaussian and non-Gaussian distribution, respectively. Concordance analysis was determined by the kappa coefficient ( $\kappa$ ). The area under the receiver operating characteristics (ROC) curve was calculated to evaluate the accuracy of each ALF to predict endoscopic, histological and clinical activity of IBD. Statistical significance was assumed for *p* values less than 0.05.

## 3. Results

### 3.1. Characteristics of patients and non-IBD controls

Seventy-two patients were studied, their mean age was  $42 \pm 12$  years, 58% were female, and 28% were smokers. The control group consisted of 28 subjects with a mean age of  $47 \pm 6$  years; 64% were female, and 35% were smokers. IBD diagnosis was CD in 49% and UC in 51% of the patients. Their mean disease duration was  $9.6 \pm 7.9$  years. All the clinical and demographic characteristics of IBD patients and controls are shown in Table 1. A clear association between smoking and concentrations of these proteins in both patients and control groups was not found (data not shown).

### 3.2. Determination of ALFs in Serum and colonic mucosa culture supernatant in patients with IBD and controls

Patients were classified into four groups according to endoscopic and clinical criteria: active ( $n = 21$ ) and quiescent ( $n = 16$ ) UC, active ( $n = 16$ ) and inactive ( $n = 19$ ) colonic CD (all of them with a CDAI  $< 150$ ).

Table 2 shows differences between serum levels of all ALFs and controls. VEGF concentration was higher in active UC patients than in patients in remission. Compared with controls, serum VEGFR3 and Ang1 concentrations were significantly higher in patients with active UC and serum Ang1 was higher in patients with active CD. Subjects with active or quiescent UC and CD had significantly higher serum levels of Tie2 than controls.

Table 3 summarizes the results in MCS. When comparing IBD patients to controls, all studied ALFs except VEGFR3,

**Table 1** Clinical and demographic characteristics of the studied inflammatory bowel disease patients and controls.

	CD	UC	Controls
N	35	37	28
Gender			
– Female	21 (60)	21 (57)	18 (64)
– Male	14 (40)	16 (43)	10 (36)
Age (years): mean $\pm$ SD	38 $\pm$ 9	46 $\pm$ 13	47 $\pm$ 6
Smoking status			
– Smoker	18 (51)	2 (5)	8 (35)
– Former smoker	6 (17)	17 (46)	2 (9)
– Non-smoker	11 (31)	18 (49)	13 (56)
Family history of IBD			
– Yes	7 (20)	8 (22)	–
– No	28 (80)	29 (78)	–
Extraintestinal manifestations of IBD			
– None	25 (71)	30 (81)	–
– Rheumatic	6 (17)	4 (11)	–
– Mucocutaneous	3 (9)	1 (3)	–
– Rheumatic + mucocutaneous	1 (3)	1 (3)	–
– Other manifestations	0 (0)	1 (3)	–
Disease duration (years): mean $\pm$ SD	7.6 $\pm$ 4.6	11.5 $\pm$ 9.7	–
Disease extension UC <sup>a</sup>			
– Proctitis	–	2 (6)	–
– Left-sided colitis	–	26 (72)	–
– Pancolitis	–	8 (22)	–
Age at diagnosis CD (years) <sup>a</sup>			
A1 ( $\leq$ 16)	1 (3)	–	–
A2 (17–40)	28 (80)	–	–
A3 ( $>$ 40)	6 (17)	–	–
Disease Location CD <sup>a</sup>			
– L1 (ileal)	8 (23)	–	–
– L2 (colic)	9 (26)	–	–
– L3 (ileocolic)	16 (46)	–	–
– L3 + L4 (upper gastrointestinal tract)	1 (3)	–	–
– L2 + L4	1 (3)	–	–
Behaviour CD <sup>a</sup>			
– B1 (non-stricturing non-penetrating)	18 (51)	–	–
– B2 (stricturing)	1 (3)	–	–
– B3 (penetrating)	4 (11)	–	–
– B1 + peri-anal disease	10 (29)	–	–
– B3 + peri-anal disease	2 (6)	–	–
Medication at endoscopy <sup>b</sup>			
– No medication	9 (26)	2 (5)	–
– 5-ASA	6 (17)	31 (84)	–
– Oral corticosteroids	2 (6)	8 (22)	–
– Azathioprine/ mercaptopurine	16 (46)	6 (16)	–
– Methotrexate	1 (3)	0 (0)	–
– TNF- $\alpha$ inhibitors	10 (29)	2 (5)	–

Abbreviations: SD, standard deviation; inflammatory bowel disease, IBD; CD, Crohn's Disease; UC, ulcerative colitis (numbers in parenthesis are percentages).

<sup>a</sup> In accordance with the Montreal classification.

<sup>b</sup> Some therapy regimens may overlap.

were elevated in patients with active disease ( $p < 0.05$ ). The same trend close to statistical significance was observed for VEGFR2 levels in patients with active CD ( $p = 0.054$ ). ALF MCS levels observed in patients with quiescent IBD did not diverge from those of controls. An exception was observed for Ang2, which was lower in patients with inactive colonic CD than in controls ( $17.6 \pm 6.6$  vs.  $21.5 \pm 6.1$  pg/mL per mg of tissue,  $p < 0.01$ ).

### 3.3. Correlation between serum and MCS ALF levels

VEGFD, VEGFR3 and Tie2 serum levels showed a positive correlation with their corresponding concentrations in MCS ( $r = 0.25$ ,  $r = 0.48$ , and  $r = 0.36$ , respectively;  $p < 0.05$ ). This correlation was negative for PlGF ( $r = -0.45$ ;  $p < 0.05$ ). Further associations between serum and MCS levels were not found for the remaining ALFs (data not shown).

### 3.4. ALF levels and IBD clinical activity

According to CDAI and Mayo global indexes, disease activity was mild in 19% of patients ( $n = 14$ ), moderate in 24% ( $n = 17$ ), and 57% ( $n = 41$ ) had no activity. Again, with the exception of VEGFR3, the levels of all the studied proteins in MCS were higher in patients with clinical activity than in those without it (Fig. 1) ( $p < 0.05$ ). In serum measurements, VEGFA, VEGFC and Ang1 were significantly higher in patients with clinical activity compared to those with inactive disease (VEGFA:  $592 \pm 447$  vs.  $395 \pm 274$  pg/mL,  $p = 0.02$ ; VEGFC:  $13.9 \pm 4.8$  vs.  $11.8 \pm 3.5$  pg/mL,  $p = 0.03$  and Ang1:  $58.7 \pm 17.6$  vs.  $50.8 \pm 14.5$  ng/mL,  $p = 0.04$ ).

MCS levels of all ALFs, except VEGFR2 and VEGFR3, significantly correlated with CD activity, as measured by the CDAI index ( $p < 0.05$ ). Regarding serum levels, VEGFR1, VEGFR2 and VEGFR3 correlated negatively with CD activity (Table 4). In UC patients, a positive correlation was found between VEGFA, VEGFR1, PlGF, Ang1, Ang2 and Tie2 MCS levels, and the Mayo score (Table 4). The correlation coefficients for these analyses were weaker than those for CDAI index in all cases. Serum VEGFA and VEGFC also correlated significantly with the Mayo score (Table 4).

There was a significant correlation between endoscopic and clinical activity in both UC ( $r = 0.873$ ;  $p < 0.001$ ) and CD ( $r = 0.62$ ;  $p < 0.001$ ).

### 3.5. ALF levels and endoscopic activity of IBD

According to the Mayo subscore and the SES-CD endoscopic indexes, IBD activity was mild in 11% ( $n = 7$ ) of patients, moderate in 31% ( $n = 19$ ) and severe in 5% ( $n = 3$ ). The remaining 53% ( $n = 33$ ) did not show endoscopic activity.

MCS concentrations of all studied ALFs except VEGFR3 were significantly varied with the endoscopic activity ( $p < 0.05$ ). VEGFR3 showed a similar trend, close to the threshold of statistical significance ( $p = 0.07$ ) (Fig. 2). These concentrations were higher in patients with endoscopic activity than in those without it ( $p < 0.05$ ). These findings were not observed for serum ALFs (data not shown).

When we studied UC and CD separately, the Mayo endoscopic sub-score significantly correlated with all ALFs in MCS and the SES-CD score correlated with all except

**Table 2** Serum concentration of ALFs in controls and patients with active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease.

	Controls	AUC	QUC	ACD	QCD
VEGF	458.1 ± 272.4	588.5 ± 382.5 <sup>#</sup>	328.2 ± 230.3	570.3 ± 487.7	411.5 ± 298.5
PlGF	15.8 ± 8	15.4 ± 9.5	13.5 ± 7.6	12.6 ± 4.9	16.3 ± 12.3
VEGFC	12 ± 3.3	13.4 ± 4.5	11.8 ± 2.5	13.6 ± 5	11.8 ± 4.4
VEGFD	672.9 ± 340.6	748.2 ± 567.7	602.2 ± 234.2	748.8 ± 398.7	613.8 ± 361.4
VEGFR1	181.3 ± 55.9	200.7 ± 43.2	173.6 ± 52.9	154.2 ± 50.2	176.8 ± 59.2
VEGFR2	12.4 ± 2.5	12 ± 2.4	12.7 ± 2.7	10.8 ± 2.6	12.3 ± 2.8
VEGFR3	24 ± 10.5	31.8 ± 14 <sup>*</sup>	24.6 ± 7.9	20.8 ± 9	26.5 ± 12.26
Ang1	44 ± 16.3	55.7 ± 10.6 <sup>*</sup>	49.2 ± 13	61.7 ± 22.8 <sup>*</sup>	50.7 ± 16.5
Ang2	2.6 ± 0.9	3 ± 1.2	2.7 ± 0.7	3.3 ± 2.1	3.1 ± 1
Tie2	23.9 ± 5	29.7 ± 7.7 <sup>*</sup>	28.5 ± 7 <sup>*</sup>	28.6 ± 6.1 <sup>*</sup>	27.6 ± 7.1 <sup>*</sup>

Vascular endothelial growth factor A and D (VEGFA, VEGFD), placental growth factor (PlGF) and vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1) concentrations are expressed in pg/mL, all other proteins in ng/mL. Abbreviations: AUC (active ulcerative colitis patients), QUC (quiescent ulcerative colitis patients), ACD (colonic active Crohn's disease patients), QCD (colonic inactive Crohn's disease patients).

\* Significant differences compared to control ( $p = 0.05$ ).

# Significant differences compared to patients in remission ( $p = 0.05$ ).

VEGFR2 and VEGFR3. Regarding serum ALF levels, Ang1 correlated with the SES-CD score and VEGFA correlated with the Mayo endoscopic subscore (Table 5).

In 60% ( $n = 22$ ) of patients with endoscopic activity, biopsies of affected and non-affected mucosa were taken for comparison. As shown in Table 6, PlGF, VEGFR2, Ang1 and Tie2 levels were higher in the affected tissue than in the non-affected tissue.

### 3.6. ALF levels and histological activity

Histological activity was mild in 20% of patients ( $n = 13$ ), moderate in 34% ( $n = 22$ ), severe in 8% ( $n = 5$ ), and 38% ( $n = 25$ ) had quiescent IBD. The concordance between endoscopic and histological activity indexes was higher in UC ( $\kappa = 0.73$ ) than in CD patients ( $\kappa = 0.55$ ). Levels of all the studied proteins in MCS also correlated significantly ( $p < 0.01$ ) with histological

activity. These concentrations diverged with the severity of histological lesions, with the highest ALF levels corresponding to patients with severe lesions (Fig. 3).

Only VEGFA and Ang1 serum levels were higher in patients with histological activity than in those without it ( $577 \pm 426$  vs.  $346 \pm 239$  pg/mL,  $p < 0.01$  and  $57.8 \pm 16.4$  vs.  $47.2 \pm 14.6$  ng/mL,  $p < 0.05$ , respectively). Further differences in serum ALF levels related to histological activity were not observed (data not shown).

### 3.7. Association of ALFs with APR

The correlations between serum ALFs and APR are shown in Table 7. Ang1 and VEGFA correlated significantly with CRP and platelet and leukocyte counts. There was a significant correlation between platelet count and VEGFA ( $r = 0.293$ ;  $p = 0.005$ ); VEGFC ( $r = 0.231$ ;  $p = 0.028$ ); VEGFR1 ( $r = 0.238$ ;

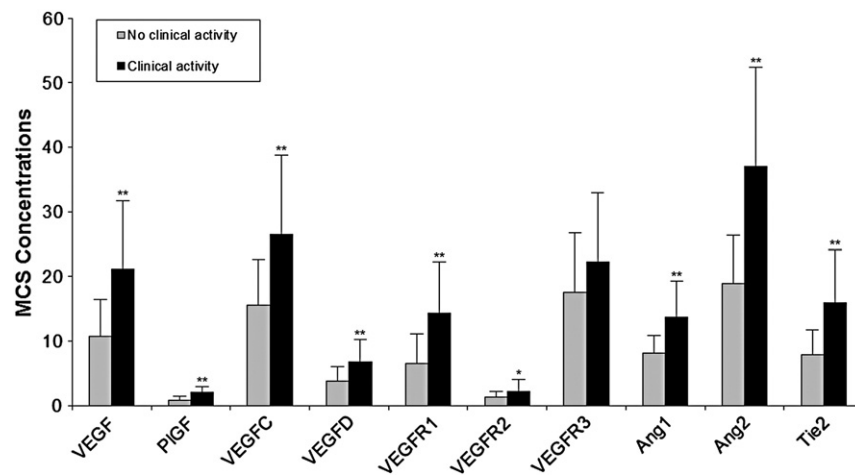
**Table 3** Tissue supernatant concentration of angiogenic and lymphangiogenic factors in controls and patients with active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease.

	Controls	AUC	QUC	ACD	QCD
VEGFA	10.7 ± 5.5	20.2 ± 9.5 <sup>*,#</sup>	12.1 ± 6.1	19.8 ± 12.1 <sup>*,#</sup>	8.9 ± 3.9
PlGF	0.9 ± 0.5	1.9 ± 0.8 <sup>*,#</sup>	1.1 ± 0.6	2.1 ± 1.1 <sup>*,#</sup>	0.7 ± 0.6
VEGFC	15.7 ± 5.8	26.6 ± 13.5 <sup>*,#</sup>	17 ± 6.1	25.2 ± 10.6 <sup>*,#</sup>	13.2 ± 5.8
VEGFD	3.7 ± 1.8	6.4 ± 3.7 <sup>*,#</sup>	4.3 ± 2.2	6.4 ± 3.2 <sup>*,#</sup>	3.1 ± 2
VEGFR1	5.5 ± 2.4	14.7 ± 9.1 <sup>*,#</sup>	5.8 ± 3.5	12.5 ± 6.2 <sup>*,#</sup>	6.3 ± 4.5
VEGFR2	1.2 ± 0.8	2.7 ± 2.3 <sup>*</sup>	1.1 ± 0.6	1.7 ± 0.9 <sup>#</sup>	1 ± 0.6
VEGFR3	200.5 ± 93.8	237.9 ± 103.1	170 ± 97.2	206 ± 98.8	170.1 ± 89.9
Ang1	8.4 ± 2.4	14 ± 5.9 <sup>*,#</sup>	8.2 ± 2.7	12.1 ± 4.9 <sup>*,#</sup>	7.9 ± 2.9
Ang2	21.5 ± 6.1	35.6 ± 17.3 <sup>*,#</sup>	19.8 ± 8.2	33.5 ± 13.5 <sup>*,#</sup>	17.6 ± 6.6 <sup>*</sup>
Tie2	6.8 ± 2.3	15.6 ± 9.4 <sup>*,#</sup>	7.7 ± 3.2	15.2 ± 5.9 <sup>*,#</sup>	7.2 ± 3.9

Vascular endothelial growth factor A and D (VEGFA, VEGFD), placenta growth factor (PlGF) and vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1) concentrations are expressed in pg/mL, all other proteins in ng/mL. Abbreviations: AUC (active ulcerative colitis patients), QUC (quiescent ulcerative colitis patients), ACD (colonic active Crohn's disease patients), QCD (colonic inactive Crohn's disease patients).

\* Significant differences compared to control ( $p = 0.05$ ).

# Significant differences compared to patients in remission ( $p = 0.05$ ).



**Figure 1** Colonic mucosa culture supernatant (MCS) concentration of angiogenic and lymphangiogenic factors based on clinical activity (in accordance to CDAI for Crohn's disease and Mayo Score for ulcerative colitis). All concentrations are expressed in pg/mL per mg of tissue, except vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3) concentration, which is expressed in pg/mL/10 per mg of tissue. Significant differences \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ .

$p = 0.025$ ); PlGF ( $r = 0.346$ ;  $p = 0.001$ ); Ang1 ( $r = 0.283$ ;  $p = 0.007$ ); Ang2 ( $r = 0.291$ ;  $p = 0.005$ ) and Tie2 ( $r = 0.254$ ;  $p = 0.016$ ) in MCS. CRP also correlated with MCS levels of VEGFA ( $r = 0.244$ ;  $p = 0.040$ ); VEGFR1 ( $r = 0.265$ ;  $p = 0.028$ ); PlGF ( $r = 0.244$ ;  $p = 0.040$ ) and Tie2 ( $r = 0.328$ ;  $p = 0.006$ ).

### 3.8. ALFs levels in serum and MCS as predictors of disease activity

MCS levels of all studied ALFs except VEGFR3 were significantly associated with endoscopic and clinical activity, and all of them with histological activity ( $p < 0.05$ ; Figs. 1, 2 and 3). The utility of these ALFs to predict endoscopic, histological and clinical activity of IBD was analysed based on the area under the ROC curve (AUC). Ang2 was the best predictor of endoscopic (AUC: 0.83, cut-off at 18.5 ng/mL, 86% sensitivity and 66% specificity), histological (AUC: 0.85, cut-off at 18.5 ng/mL, 89% sensitivity and 72% specificity)

and clinical activity (AUC: 0.90, cut-off at 22.1 ng/mL, 83% sensitivity and 84% specificity).

For ALFs in serum, the AUCs were lower than those for the corresponding ALFs in MCS (data not shown). VEGFA and Ang-1 levels were more increased in patients with histological activity than in those without it. The AUC for the diagnosis of histological activity was 0.68 for Ang1 (cut-off at 52.0 ng/mL: 64% sensitivity and 68% specificity) and 0.67 for VEGFA (cut-off at 340.6 ng/mL: 64% sensitivity and 60% specificity).

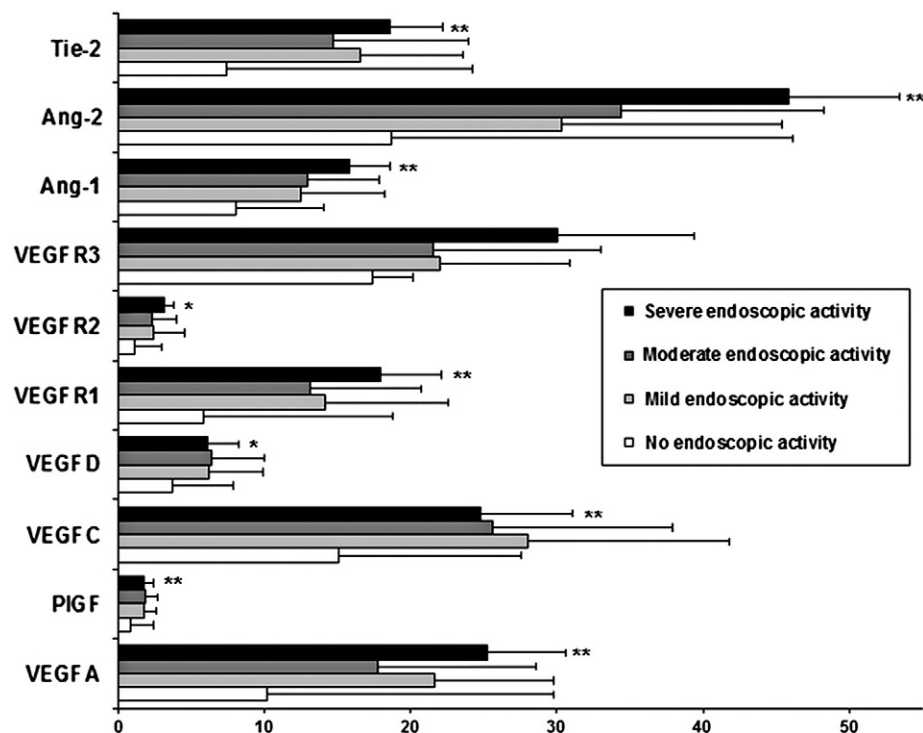
VEGFA, VEGFC and Ang1 had higher serum levels ( $p < 0.05$ ) in patients with clinically-active IBD compared to those with inactive disease. The AUC for the diagnosis of this clinical activity was lower than 0.65 for all ALFs in serum except for VEGFA (0.67). The cut-off point with the best sensitivity (60%) and specificity (68%) for the identification of clinical activity was 379 pg/mL/per mg of tissue for serum VEGFA.

Regarding endoscopic activity, a significant positive correlation was only found between Ang1 serum levels and the SES-CD index, and between VEGFA serum levels and the

**Table 4** Correlation coefficients ( $r$ ) for the relationships between serum and colonic mucosa culture supernatant angiogenic (MCS) and lymphangiogenic factors levels and clinical indexes.

	Serum levels		MCS levels	
	CDAI index	Mayo Index	CDAI index	Mayo index
VEGFA	0.190; $p = 0.282$	0.389; $p = 0.017^a$	0.541; $p = 0.001^a$	0.386; $p = 0.018^a$
PlGF	-0.06; $p = 0.973$	0.324; $p = 0.051$	0.561; $p = 0.001^a$	0.416; $p = 0.010^a$
VEGFC	0.167; $p = 0.346$	0.405; $p = 0.013^a$	0.561; $p = 0.001^a$	0.147; $p = 0.391$
VEGFD	0.080; $p = 0.653$	0.075; $p = 0.661$	0.607; $p < 0.001^a$	0.111; $p = 0.512$
VEGFR1	-0.354; $p = 0.04^a$	0.294; $p = 0.78$	0.494; $p = 0.003^a$	0.424; $p = 0.011^a$
VEGFR2	-0.352; $p = 0.042^a$	-0.13; $p = 0.940$	0.273; $p = 0.118$	0.131; $p = 0.452$
VEGFR3	-0.418; $p = 0.014^a$	0.269; $p = 0.108$	0.213; $p = 0.226$	0.197; $p = 0.249$
Ang1	0.265; $p = 0.130$	0.242; $p = 0.150$	0.599; $p < 0.001^a$	0.400; $p = 0.16^a$
Ang2	0.112; $p = 0.529$	0.185; $p = 0.274$	0.662; $p < 0.001^a$	0.561; $p < 0.001^a$
Tie2	0.138; $p = 0.436$	0.119; $p = 0.481$	0.558; $p = 0.001^a$	0.449; $p = 0.006^a$

<sup>a</sup> Statistically significant differences.



**Figure 2** Comparison of angiogenic and lymphangiogenic factor levels in colonic mucosa culture supernatant according to endoscopic activity. All concentrations are expressed in pg/mL per mg of tissue, except vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3) concentration, which is expressed in pg/mL/10 per mg of tissue. Significant differences \*\* $p = 0.01$ . \* $p = 0.05$ .

Mayo endoscopic sub-score (Table 5). To predict endoscopic activity in CD patients, the AUC for Ang1 in serum was 0.65 (cut-off at 47.8 ng/mL, 67% sensitivity and 52% specificity). In UC patients, the AUC for the diagnosis of endoscopic activity was 0.72 for VEGFA (cut-off at 341 ng/mL, 85% sensitivity and 64% specificity).

#### 4. Discussion

The role played by angiogenesis and lymphangiogenesis in IBD is still being elucidated. In our study, ALF levels were locally high in MCS. All studied proteins except VEGFR3 were significantly higher in patients with endoscopic and clinical IBD activity compared to those in remission. In colorectal cancer, immunohistochemical studies carried out in both normal and tumour tissues show that only a small proportion of blood vessels express VEGFR3. The expression of this factor was not associated with tumour stage, but it was closely related with the presence of inflammatory infiltrate.<sup>30</sup> It has been reported that infiltrating macrophages are an important source of ALFs such as VEGFA and inflammatory cytokines.<sup>31</sup> These cytokines may modulate the expression of VEGF family members, and have been shown to up-regulate expression of VEGFR2, but not VEGFR3, in endothelial cells.<sup>30,32</sup> There is no clear candidate molecule that might up-regulate the expression of VEGFR3. Paavonen et al.<sup>33</sup> have observed low levels of this protein in inflammatory skin ulcers in humans, together with transient expression in experimental wounds in a pig model. They suggest that this transient expression may be an integral

part of normal wound healing and the relative absence of lymphatic vessels might account for impaired healing in chronic wounds. The unchanged VEGFR3 levels in MCS might be consistent with an IBD associated failure to adequately mobilize lymphatics leading to an overall hypofunction of this vasculature. These data are in accordance with Alexander et al.<sup>34</sup>, who reported an inability to mobilize lymphatic expansion as an adaptive response in IBD. Lymphatic failure in chronic disease would result in accumulation of cytokines and immune cells exacerbating IBD.

The independent and uncertain behaviour of VEGFR3 in other pathologies and animal models coincide with the lack of differences in the levels of this protein between patients with active IBD compared to inactive IBD and also vs. healthy controls shown in this study. The up-regulation of VEGFR2 and the stability of VEGFR3 levels suggest that the pro-lymphangiogenic function of VEGFC and D could be driven by VEGFR2 instead of the VEGFR3 pathway during the active period of IBD.

This is the first study to analyse the levels of VEGFR3 in supernatant from primary cultures of bowel mucosa and their association with this disease.

With respect to the remaining proteins studied, most of the previous investigations on ALFs have been carried out in serum and tissue by immunohistochemistry. Recent publications suggest that altered angiogenesis may be a critical component of IBD pathogenesis.<sup>15,35,36</sup> The exception is the study by Kapsoritakis et al.<sup>37</sup>, who observed weaker VEGFA immunostaining intensity in patients with active CD vs. healthy controls, while that of patients with UC was similar, suggesting that the course of UC is not VEGFA-dependent.



**Table 5** Correlation coefficients (r) for the relationships between endoscopic indexes and angiogenic and lymphangiogenic factors levels in serum and colonic mucosa culture supernatant (MCS).

	Serum levels		MCS levels	
	SES-CD index Score	Mayo endoscopic subscore	SES-CD index score	Mayo endoscopic subscore
VEGFA	0.260; $p = 0.165$	0.397; $p = 0.015^a$	0.354; $p = 0.059^a$	0.531; $p = 0.001^a$
PlGF	0.127; $p = 0.505$	0.131; $p = 0.438$	0.429; $p = 0.020^a$	0.550; $p < 0.001^a$
VEGFC	0.238; $p = 0.205$	0.114; $p = 0.503$	0.396; $p = 0.033^a$	0.338; $p = 0.044^a$
VEGFD	0.278; $p = 0.137$	0.025; $p = 0.884$	0.353; $p = 0.06^a$	0.343; $p = 0.038^a$
VEGFR1	-0.114; $p = 0.549$	0.220; $p = 0.191$	0.435; $p = 0.018^a$	0.597; $p < 0.001^a$
VEGFR2	-0.124; $p = 0.514$	-0.113; $p = 0.507$	0.247; $p = 0.197$	0.373; $p = 0.027^a$
VEGFR3	-0.287; $p = 0.125$	0.254; $p = 0.129$	0.170; $p = 0.378$	0.399; $p = 0.016^a$
Ang1	0.362; $p = 0.049^a$	0.194; $p = 0.251$	0.441; $p = 0.017^a$	0.564; $p < 0.001^a$
Ang2	-0.285; $p = 0.126$	0.152; $p = 0.369$	0.451; $p = 0.014^a$	0.654; $p < 0.001^a$
Tie2	-0.007; $p = 0.971$	0.017; $p = 0.918$	0.500; $p = 0.006^a$	0.571; $p < 0.001^a$

<sup>a</sup> Statistically significant differences.

The differences with our results are probably due to the method used to assess the levels of the proteins studied. The authors Kapsoritakis et al. measured tissue expression while we evaluated levels of soluble ALFs. Both immunohistochemistry and MCS levels reflect ALF expression in colonic mucosa, but the latter detects proteins that have been released to the surrounding medium and are not anchored to a sub-cellular location.

The biological meaning of elevated ALF concentrations in MCS with respect to the development of IBD is unknown. Our results concur with those of previous studies, showing increased expression of VEGFA in colonic mucosa from IBD patients.<sup>16,38,42</sup> The intestinal mucosa has been considered a possible origin of elevated VEGFA serum levels in patients with active IBD.<sup>43</sup> Clinical studies and animal models of experimental colitis also showed increased microvascular density in the mucosal and submucosal tissue<sup>15,17,35</sup> and up-regulation of pro-angiogenic factors such as VEGFA,<sup>16,38–42</sup> basic fibroblast growth factor (bFGF),<sup>42</sup> platelet-derived growth factor (PDGF),<sup>42</sup> and placental growth factor (PlGF).<sup>44</sup> Concerning other chronic inflammatory diseases, Schroeder et al. found elevated expression of VEGFA, VEGFR1, -R2, Tie2, and

the Ang1/Ang2 ratio in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis compared to patients with osteoarthritis.<sup>6</sup>

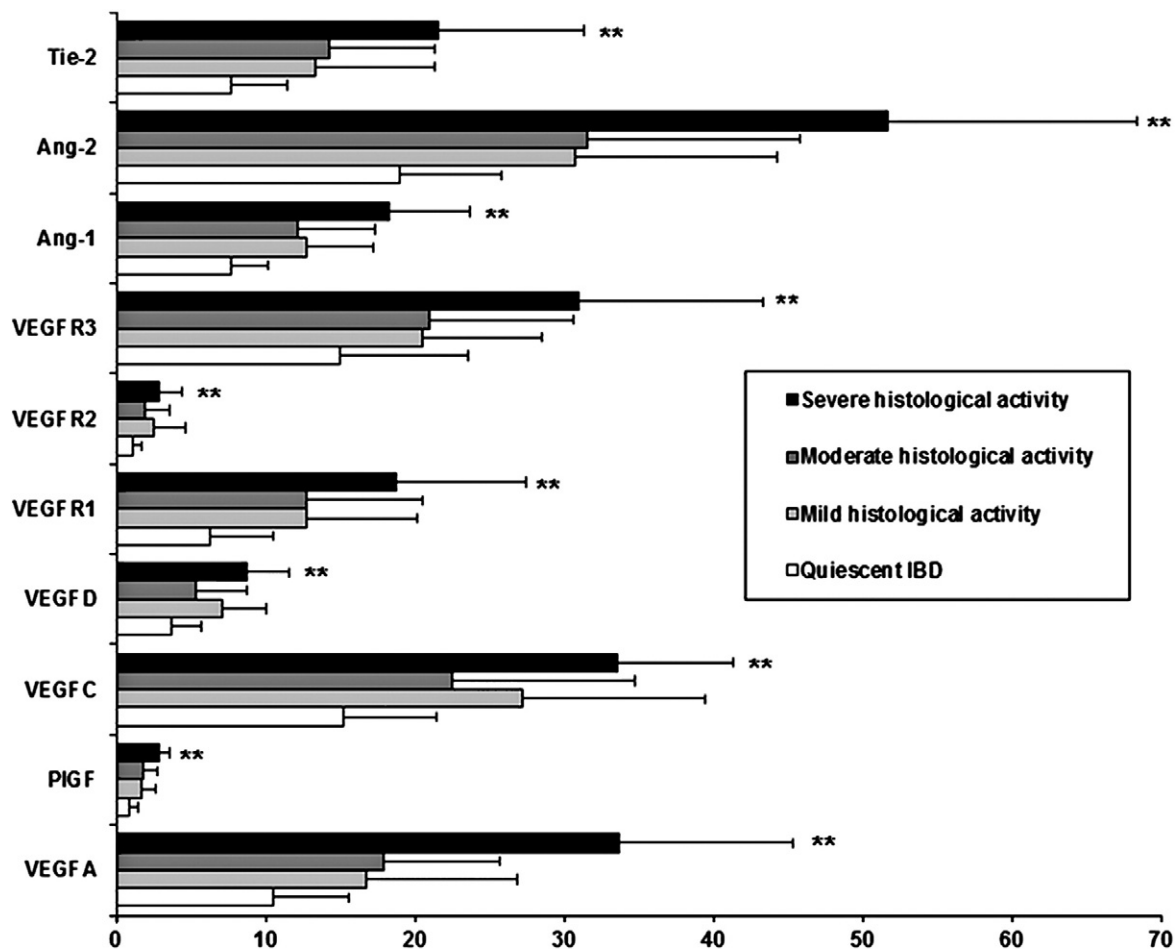
Regarding the site of the tissue collection, Griga et al.<sup>41</sup> reported significantly higher VEGFA immunohistochemical staining in the epithelium and the lamina propria of inflamed colonic mucosa of patients with IBD, compared with non-inflamed patients. The same authors<sup>41</sup> observed increased expression of VEGFA in MCS from patients with active IBD compared with a group of patients with irritable bowel syndrome. To our knowledge, further studies comparing both affected and non-affected mucosa from the same subject have not been reported. In our patients, VEGFA levels tended to be higher in MCS from affected mucosa ( $p = 0.07$ ) PlGF, VEGFC, VEGFR2, Ang1 and Tie2 concentrations were significantly higher in areas with macroscopic damage than in non-affected areas. High levels of the remaining proteins were found in both affected and non-affected mucosa, but the values observed in non-affected tissue were still higher than those found in patients in remission. These results reflect that in patients with active disease, macroscopically “normal” mucosa is sometimes altered at the microscopic and/or molecular level.

With respect to clinical disease indexes, most of the studies show a correlation between serum VEGFA levels and disease activity.<sup>39,42,45,46</sup> Kanazawa et al.<sup>42</sup> reported increased VEGFA levels in the serum and colonic tissue of patients with active UC. Likewise, Bousvaros et al.<sup>46</sup> showed that serum VEGFA levels in children and young adults were elevated during active CD. In our study, serum VEGFA levels correlated with clinical activity in UC but not in CD patients. The same was found with respect to endoscopic activity. In contrast, Ang1 correlated with endoscopic activity in patients with CD, but not with UC, while no association was found with clinical activity. These observations should be considered with caution because, although  $p$  values were significant, the correlation coefficients were not very high. Finally, serum concentrations of both factors were higher in patients with a histological diagnosis of active vs. non-active disease, suggesting that they are a reflection of the events that are taking place at the microscopic level. VEGFA and Ang1 also correlated with the inflammatory marker CRP and with an increase in the number of leukocytes and platelets, which release both angiogenic factors during inflammation processes.

**Table 6** Comparison of angiogenic and lymphangiogenic factor levels in colonic mucosa culture supernatant (MCS) from affected and non-affected mucosa. Concentrations are expressed in pg/mL per mg of tissue.

	Non-affected mucosa	Affected mucosa	$p$ -Value
VEGF	16.5 ± 10.3	22 ± 11.4	0.07
PlGF	1.6 ± 0.8	2.3 ± 0.8	<0.01 *
VEGFC	24.5 ± 10.5	32 ± 10.8	<0.01 *
VEGFD	8.7 ± 4	8.2 ± 2.8	0.6
VEGFR1	15.1 ± 15.2	15.5 ± 8.4	0.9
VEGFR2	2.4 ± 1	4.5 ± 4.6	<0.05 *
VEGFR3	221.6 ± 100.5	228.7 ± 107	0.8
Ang1	10.7 ± 4.8	14.6 ± 5.9	<0.01 *
Ang2	33.5 ± 17.8	39.1 ± 15.3	0.1
Tie2	10.7 ± 5.2	16.9 ± 7.8	<0.01 *

\* Significant differences  $p < 0.05$ .



**Figure 3** Comparison of angiogenic and lymphangiogenic factor levels in colonic mucosa culture supernatant according histological activity. All concentrations are expressed in pg/mL per mg of tissue, except vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3) concentration, which is expressed in pg/mL/10 per mg of tissue. \*\*Significant differences  $p < 0.01$ .

There was a good correlation between ALFs in MCS and the endoscopic, histological and clinical activity of the IBD. This gives us an idea of the severity of the injuries and, although most of the ALFs could be useful as IBD markers,

Ang2 seems to be the most accurate. Ang1 and Ang2 are antagonistic ligands that bind to the extracellular domain of Tie2 receptor, which is almost exclusively expressed by endothelial cells. In critically ill patients, a marked imbalance

**Table 7** Correlation coefficients (r) for the relationships between serum angiogenic and lymphangiogenic factors levels and acute phase reactants.

	CRP	ESR	LC	PLC	Haemoglobin
VEGFA	0.341; $p = 0.004^a$	0.248; $p = 0.06$	0.277; $p = 0.008^a$	0.412; $p < 0.001^a$	-0.123; $p = 0.245$
PlGF	0.233; $p = 0.51$	0.069; $p = 0.605$	0.257; $p = 0.014^a$	0.066; $p = 0.537$	-0.75; $p = 0.479$
VEGFC	0.052; $p = 0.665$	-0.073; $p = 0.588$	0.360; $p < 0.001^a$	0.380; $p < 0.001^a$	0.085; $p = 0.425$
VEGFD	0.054; $p = 0.656$	0.159; $p = 0.234$	-0.46; $p = 0.664$	-0.069; $p = 0.518$	0.008; $p = 0.938$
VEGFR1	0.040; $p = 0.743$	0.002; $p = 0.988$	0.345; $p = 0.001^a$	0.072; $p = 0.495$	0.176; $p = 0.096$
VEGFR2	-0.073; $p = 0.545$	-0.046; $p = 0.732$	0.319; $p = 0.002^a$	0.023; $p = 0.832$	0.094; $p = 0.376$
VEGFR3	0.033; $p = 0.786$	-0.096; $p = 0.475$	0.196; $p = 0.062$	-0.19; $p = 0.857$	-0.51; $p = 0.629$
Ang1	0.286; $p = 0.016^a$	0.130; $p = 0.332$	0.421; $p < 0.001^a$	0.599; $p < 0.001^a$	0.064; $p = 0.549$
Ang2	-0.115; $p = 0.341$	0.041; $p = 0.761$	-0.014; $p = 0.896$	-0.047; $p = 0.660$	-0.274; $p = 0.009^a$
c	0.091; $p = 0.448$	0.017; $p = 0.901$	0.040; $p = 0.704$	0.109; $p = 0.306$	-0.52; $p = 0.625$

Abbreviations: CRP: C-reactive protein (mg/L); LC: leukocyte count ( $10^9/L$ ); PLC: platelet count ( $10^9/L$ ); haemoglobin (g/L); and ESR: erythrocyte sedimentation rate (mm/h).

<sup>a</sup> Statistically significant correlation.

of the angiopoietin-Tie system in favour of Ang2 has been confirmed. Several studies evidence that Ang2 concentrations correlate with the severity of the illness.<sup>47–49</sup>

Our results do not show a good correlation between ALF levels in serum and MCS, indicating that local variations in the concentrations of the factors studied do not correspond with circulating proteins. Nevertheless, in our study, ALF alterations at a local level appear to be a fact, although in view of the results obtained, we cannot determine whether such variations are a cause or a consequence of IBD lesions that perpetuate the existing inflammation. In spite of this, the study of some of these ALFs as possible targets in new therapies for IBD constitutes a key new line of research. Our ideal would be to find a serum activity marker that could avoid the performance of aggressive procedures like colonoscopy. Only serum VEGFA and Ang1 seem to be useful markers of endoscopic, histological and clinical activity. In view of our results, serum ALF levels cannot be recommended as predictors of IBD activity at the moment.

## Conflicts of interest

Alicia Algaba benefited from a grant by Merck Sharp and Dohme (MSD) Spain. This activity is outside the submitted work.

## Acknowledgements

This research was funded by a grant from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain (Ref. PS02369).

We thank Mc Lehm Language Services for kindly reviewing the English used in this paper.

## References

1. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;**386**:671–4.
2. Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med* 2006;**57**:1–18.
3. Halin C, Detmar M. Chapter 1. Inflammation, angiogenesis, and lymphangiogenesis. *Methods Enzymol* 2008;**445**:1–25.
4. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 2005;**109**:227–41.
5. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;**1**:27–31.
6. Schroeder M, Viezens L, Fuhrhop I, Rüther W, Schaefer C, Schwarzloh B, et al. Angiogenic growth factors in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* Nov 9 2011.
7. Shimoda H, Kato S. A model for lymphatic regeneration in tissue repair of the intestinal muscle coat. *Int Rev Cytol* 2006;**250**:73–108.
8. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 2005;**438**:946–53.
9. Cao Y. Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nat Rev Cancer* 2005;**5**:735–43.
10. Cueni LN, Detmar M. New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease. *J Invest Dermatol* 2006;**126**:2167–77.
11. Bamias G, Martin C, Mishina M, Ross WG, Rivera-Nieves J, Marini M, et al. Proinflammatory effects of TH2 cytokines in a murine model of chronic small intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2005;**128**:654–66.
12. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;**115**:182–205.
13. Katz JA, Itoh J, Fiocchi C. Pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 1999;**15**:291–7.
14. Hatoum OA, Binion DG. The vasculature and inflammatory bowel disease: contribution to pathogenesis and clinical pathology. *Inflamm Bowel Dis* 2005;**11**:304–13.
15. Danese S, Sans M, de la Motte C, Graziani C, West G, Phillips MH, et al. Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2006;**130**:2060–73.
16. Sandor Z, Deng XM, Khomenko T, Tarnawski AS, Szabo S. Altered angiogenic balance in ulcerative colitis: a key to impaired healing? *Biochem Biophys Res Commun* 2006;**350**:147–50.
17. Chidlow Jr JH, Langston W, Greer JJ, Ostanin D, Abdelbaqi M, Houghton J, et al. Differential angiogenic regulation of experimental colitis. *Am J Pathol* 2006;**169**:2014–30.
18. Pousa ID, Mate J, Gisbert JP. Angiogenesis in inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Invest* 2008;**38**:73–81.
19. Linares PM, Gisbert JP. Role of growth factors in the development of lymphangiogenesis driven by inflammatory bowel disease: a review. *Inflamm Bowel Dis* 2011;**17**:1814–21.
20. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1989;**170**:2–6 [discussion 16–9].
21. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;**55**:749–53.
22. Sipponen T, Nuutinen H, Turunen U, Färkkilä M. Endoscopic evaluation of Crohn's disease activity: comparison of the CDEIS and the SES-CD. *Inflamm Bowel Dis* 2010;**16**:2131–6.
23. Moskovitz D, Daperno M, Van Assche G. Defining and validating cut-offs for the simple endoscopic score for Crohn's disease. *Gastroenterology* 2007;**132**:A-S1097.
24. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med* 1987;**317**:1625–9.
25. D'Haens G, Geboes K, Ponette E, Penninckx F, Rutgeerts P. Healing of severe recurrent ileitis with azathioprine therapy in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997;**112**:1475–81.
26. Riley SA, Mani V, Goodman MJ, Herd ME, Dutt S, Turnberg LA. Comparison of delayed release 5 aminosalicylic acid (mesalazine) and sulphasalazine in the treatment of mild to moderate ulcerative colitis relapse. *Gut* 1988;**29**:669–74.
27. Best WR, Beckett JM, Singleton JW. Rederived values of the eight coefficients of the Crohn's Disease Activity Index (CDAI). *Gastroenterology* 1979;**77**:843–6.
28. Salcedo X, Medina J, Sanz-Cameno P, García-Buey L, Martín-Vilchez S, Borque MJ, et al. The potential of angiogenesis soluble markers in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005;**42**:696–701.
29. Pousa ID, Mate J, Salcedo-Mora X, Abreu MT, Moreno-Otero R, Gisbert JP. Role of vascular endothelial growth factor and angiopoietin systems in serum of Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2008;**14**:61–7.
30. White JD, Hewett PW, Kosuge D, McCulloch T, Enholm BC, Carmichael J, et al. Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. *Cancer Res* 2002;**62**:1669–75.
31. McCourt M, Wang JH, Sookhai S, Redmond HP. Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis. *Arch Surg* 1999;**134**:1325–31 [discussion 31–2].
32. Ristimäki A, Narko K, Enholm B, Joukov V, Alitalo K. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J Biol Chem* 1998;**273**:8413–8.



33. Paavonen K, Puolakkainen P, Jussila L, Jahkola T, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am J Pathol* 2000;**156**:1499–504.
34. Alexander JS, Chaitanya GV, Grisham MB, Boktor M. Emerging roles of lymphatics in inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci* Oct 2010;**1207**(Suppl 1):E75–85.
35. Spalinger J, Patriquin H, Miron MC, Marx G, Herzog D, Dubois J, et al. Doppler US in patients with crohn disease: vessel density in the diseased bowel reflects disease activity. *Radiology* 2000;**217**:787–91.
36. Koutroubakis IE, Tsiolakidou G, Karmiris K, Kouroumalis EA. Role of angiogenesis in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;**12**:515–23.
37. Kapsoritakis A, Sfiridaki A, Maltezos E, Simopoulos K, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. Vascular endothelial growth factor in inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 2003;**18**:418–22.
38. Pousa ID, Algaba A, Linares PM, Sanz-Cameno P, Maté J, Moreno-Otero R, et al. Corticosteroids modulate angiogenic soluble factors in ulcerative colitis patients. *Dig Dis Sci* 2011;**56**:871–9.
39. Griga T, Tromm A, Spranger J, May B. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1998;**33**:504–8.
40. Griga T, Voigt E, Gretzer B, Brasch F, May B. Increased production of vascular endothelial growth factor by intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 1999;**46**:920–3.
41. Griga T, May B, Pfisterer O, Müller KM, Brasch F. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 2002;**49**:116–23.
42. Kanazawa S, Tsunoda T, Onuma E, Majima T, Kagiya M, Kikuchi K. VEGF, basic-FGF, and TGF-beta in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol* 2001;**96**:822–8.
43. Griga T, Werner S, Koller M, Tromm A, May B. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in Crohn's disease: increased production by peripheral blood mononuclear cells and decreased VEGF165 labeling of peripheral CD14+ monocytes. *Dig Dis Sci* 1999;**44**:1196–201.
44. Hindryckx P, Waeytens A, Laukens D, Peeters H, Van Huysse J, Ferdinande L, et al. Absence of placental growth factor blocks dextran sulfate-induced colonic mucosal angiogenesis, increases mucosal hypoxia and aggravates acute colonic injury. *Lab Invest* 2010;**90**:566–76.
45. Scaldaferrri F, Vetrano S, Sans M, Arena V, Straface G, Stigliano E, et al. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2009;**136**:585–95 [e5].
46. Bousvaros A, Leichtner A, Zurakowski D, Kwon J, Law T, Keough K, et al. Elevated serum vascular endothelial growth factor in children and young adults with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1999;**44**:424–30.
47. Ganter MT, Cohen MJ, Brohi K, Chesebro BB, Staudenmayer KL, Rahn P, et al. Angiopoietin-2, marker and mediator of endothelial activation with prognostic significance early after trauma? *Ann Surg* 2008;**247**:320–6.
48. Gallagher DC, Parikh SM, Balonov K, Miller A, Gautam S, Talmor D, et al. Circulating angiopoietin 2 correlates with mortality in a surgical population with acute lung injury/adult respiratory distress syndrome. *Shock* 2008;**29**:656–61.
49. Ganta VC, Cromer W, Mills GL, Traylor J, Jennings M, Daley S, et al. Angiopoietin-2 in experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis* Jun 2010;**16**(6):1029–39.



REVIEW ARTICLE

# Angiopoietins in inflammation and their implication in the development of inflammatory bowel disease. A review



Pablo M. Linares\*, María Chaparro, Javier P. Gisbert

Gastroenterology Unit, Hospital Universitario de La Princesa and Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IP), Madrid, Spain  
Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Spain

Received 9 April 2013; accepted 19 June 2013

## KEYWORDS

Angiogenesis;  
Angiopoietins;  
Growth factors;  
Crohn's disease;  
Ulcerative colitis;  
Inflammatory bowel disease

## Abstract

**Background:** Angiopoietins are essential angiogenic mediators. Since inflammatory bowel disease (IBD) involves inflammation, ulceration and regeneration of the intestinal mucosa, the angiopoietin system has been proposed as a factor to maintain pathological angiogenesis during the development of the IBD.

**Aim:** To review the potential role of angiopoietins in the inflammation driven by angiogenesis during the course of the IBD.

**Methods:** Publications were identified by PubMed searches using the following key words: angiopoietin; Tie-2 receptor; angiogenesis; inflammatory bowel disease and inflammation, in various combinations.

**Results:** Angiopoietin-1 acts as a regulator of blood vessel maturation and has anti-inflammatory properties, whereas angiopoietin-2 marks the onset of angiogenesis and is required for normal formation of lymph vessels. Both angiopoietins make use of their angiogenic regulatory effects via the angiopoietin tyrosine-kinase receptor (Tie-2). While angiogenesis has been shown to promote and sustain many events of inflammation, the involvement of the angiopoietin system in IBD has been reported in few studies. It is not clear whether the angiopoietins' role in the development of intestinal inflammation is due to an imbalance in the levels of these proteins or this system exerts its pro-angiogenic properties through a different mechanism during the close-loop relationship between angiogenesis and inflammation.

**Abbreviations:** IBD, inflammatory bowel disease; CD, Crohn's disease; UC, ulcerative colitis; Ang-1, angiopoietin-1; Ang-2, angiopoietin-2; Tie-2, angiopoietin tyrosine-kinase receptor; VEGF, vascular endothelial growth factor; EC, endothelial cell; VSMCs, vascular smooth muscle cells

\* Corresponding author at: C Rio Águeda, 6, 28023 Madrid. Spain. Tel.: +34 667365335.

E-mail address: [pablus@hotmail.com](mailto:pablus@hotmail.com) (P.M. Linares).

*Conclusions:* Angiopoietins have key functions in the angiogenic process, and their abnormal activation might depend on their surrounding inflamed environment. The determination of these angiogenic factors in serum and tissue could be useful for monitoring IBD progression.

© 2013 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of European Crohn's and Colitis Organisation. Open access under [CC BY-NC-ND license](#).

## Contents

1. Introduction . . . . .	184
2. Methods . . . . .	184
2.1. Angiogenesis . . . . .	184
2.2. Cytokines and angiogenesis . . . . .	185
2.3. Angiopoietin family . . . . .	185
2.4. Angiopoietin-1 . . . . .	185
2.5. Angiopoietin-2 . . . . .	185
2.6. Angiopoietin-3/Angiopoietin-4 . . . . .	186
2.7. Angiopoietins and the lymphatic system . . . . .	186
2.8. Angiopoietins in animal models . . . . .	187
2.9. Role of angiopoietins in IBD . . . . .	187
3. Conclusions . . . . .	188
Conflict of interest . . . . .	188
Acknowledgments . . . . .	188
References . . . . .	188

## 1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic inflammatory disorder that encompasses two different clinical entities: Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) <sup>1,2</sup>. CD may affect any part of the gut from the mouth to the anus, though it is usually located in the terminal ileum and colon. It is characterized by macroscopic affection and segmental distribution along the gut. On the other hand, UC affects the mucosa of the colon with variable extension from the rectum to the cecum on a continuous basis.

The etiology of CD and UC remains unclear, but it is characterized by inflammation located in the gut due to an altered immune response. Genetic and environmental factors in the development of both diseases are known to be involved <sup>3,4</sup>.

During the clinical course of both conditions, flare-ups in activity, characterized by an increase and exacerbation of inflammation, alternate with remission periods. The number, frequency and severity of these flares are unpredictable. Recent investigations have been conducted to elucidate the etiology of these diseases and the factors that might influence their evolution.

For instance, IBD is associated with extensive tissue injury and lymphatic remodeling caused by tissue edema, inflammatory cell infiltrates, numerical or functional alteration of certain subpopulations of immune cells, loss of epithelial integrity and increased angiogenesis. These features, together with the release of cytokines in the intestinal mucosa, might contribute to the pathogenesis and development of IBD by triggering diverse molecular mechanisms <sup>5–7</sup>. Recently, scientific evidence suggests that vascular development, particularly lymphangiogenesis and angiogenesis, could play a main role as

a cause of IBD tissue injury and not simply an epiphenomenon ascribed to inflammation <sup>5,8–10</sup>.

## 2. Methods

Bibliographical searches were performed in PubMed from the earliest records to February 2012 using the following key words (all fields): (angiopoietin OR Tie-2 receptor OR angiogenesis) AND (inflammatory bowel disease OR inflammation). The references from the articles selected for the study were also examined in search of articles meeting the inclusion criteria. Relevant abstracts and other material from meetings were investigated. Studies on angiopoietin function in other diseases were included if relevant information was reported.

### 2.1. Angiogenesis

Blood vessels originate through two processes called vasculogenesis and angiogenesis. Vasculogenesis starts in the embryonic period from multipotent progenitor cells, while in angiogenesis the vascular networks are created from the pre-existing ones. Physiological angiogenesis takes place during processes like the menstrual cycle, embryonic development, tissue repair and bone growth. <sup>11,12</sup> Angiogenesis is considered to be activated primarily by hypoxia <sup>7,13</sup>. Afterwards, the basal membrane is degraded by metalloproteases and endothelial cells (ECs) proliferate, triggered by the released integrins and adhesion molecules. Finally, pericyte recruitment stabilizes the newly-formed vessels. Upon stabilization and structuring of the new microvessel network, the balance between proangiogenic and antiangiogenic factors in physiological angiogenesis returns to the baseline levels and the

process concludes. However, the level of proangiogenic mediators in pathologic angiogenesis remains augmented and formation of new vessels persists<sup>14</sup>. Altered angiogenesis has been reported in other inflammatory diseases such as cancer, atherosclerosis, ischemic heart disease, rheumatoid arthritis or asthma<sup>12,15,16</sup>.

## 2.2. Cytokines and angiogenesis

As a result of the reciprocal angiogenesis–inflammation activation processes, there is an increase of proinflammatory cytokines, chemokines, eicosanoids, thromboxanes and free radicals in the interstitial medium. Among these released proteins, the most important angiogenic mediator, VEGF-A, has recently gained special relevance. For instance, increased levels of VEGF-A released during active episodes of IBD increase endothelial expression of intercellular adhesion molecule-1 to promote enhanced leukocyte adhesion<sup>17</sup>. Additional VEGF-A action increases blood vascular permeability which intensifies gut edema, a central characteristic of IBD. Finally, new blood vessels formed in the inflamed gut in response to VEGF-A may exhibit delayed maturation, displaying incomplete recruitment of pericytes necessary to stabilize vessels, inhibit endothelial proliferation and reduce vascular leakage<sup>18,19</sup>. Besides the classic angiogenic factors such as VEGF-A, the angiopoietin Ang/Tie system plays an important and complementary role in the regression, maturation and stabilization of blood vessels<sup>20,21</sup>.

## 2.3. Angiopoietin family

Ang-1, Ang-2 and the interspecies orthologs such as Ang-3 (mouse)/Ang-4 (human) are natural ligands of the Tie-2 receptor, which is expressed primarily on ECs and early hematopoietic cells. The other kinase receptor, Tie-1, is an orphan receptor that may also act as an angiopoietin receptor, possibly in complex with Tie-2, but little is known about its function in angiogenesis<sup>22–29</sup>. Angiopoietins do not belong to the VEGF family, but are also key mediators in angiogenesis. The Ang/Tie receptor signaling cascades are involved in fundamental angiogenesis events including vascular stabilization and remodeling, as well as recruitment of pericytes and vascular smooth muscle cells (VSMCs). Ang-1 acts as a regulator of blood vessel maturation and has anti-inflammatory properties. Its stimulation in lymphatic ECs promotes up-regulation of a VEGF receptor – VEGFR-3 – suggesting that it is also indirectly involved in VEGF-C/VEGFR-3 pathway (Fig. 1). On the other hand, Ang-2 is particularly responsible for the initiation of angiogenesis and it is necessary for the normal formation of lymphatic vasculature<sup>25,28,30–34</sup>.

## 2.4. Angiopoietin-1

The first angiopoietin that was discovered was Ang-1 which is secreted by pericytes, mesenchyme and VSMCs of the developing vasculature and it is thought that it stabilizes the formation of newly formed blood vessels<sup>25,35</sup>.

Ang-1 promotes EC cell stability by inducing Tie-2 phosphorylation (p-Tie-2) and suppressing endothelial migration, which enhances survival<sup>25,36–42</sup>. It leads to the induction and maintenance of a 'quiescent' phenotype in capillaries. Ang-1

also protects against airway inflammation and hyperreactivity in asthma<sup>43,44</sup>, reduces thrombin-induced interleukin-8 production and neutrophil adhesion<sup>45</sup>, decreases VEGF-induced up-regulation of inflammatory adhesion molecules<sup>46</sup>, prevents endothelial hyperpermeability, thereby maintaining vessel integrity, and inhibits leukocyte-endothelium interactions<sup>27,30</sup>. Ang-1 and VEGF-A are thought to have a complementary effect on blood vessel growth which could be due to both ligands being able to activate the receptor Tie-2 (Fig. 1).

The release of Ang-1 protein from neutrophils differs from secretion of VEGF-A, because Ang-1 is cytosolic and its release is neither dependent on calcium, TNF- $\alpha$  nor other neutrophil-activating cytokines<sup>47</sup>. Ang-1 is expressed in the prostate, skeletal muscle, small intestine, heart, and areas of the brain<sup>26</sup>.

Targeted disruption of Tie-2 or Ang-1 results in embryonic lethality, which occurs at a slightly later stage than that seen in VEGF-A knockout animals<sup>48</sup>. However, in the postnatal vasculature, Ang-1 appears to play a predominant role in the maintenance of endothelial homeostasis and prevention of vascular inflammation through the activation of Tie-2<sup>49</sup>.

Ang-1 and Ang-2 have been shown to interact with other receptors, including integrins<sup>50</sup>. Monomeric DeltaAng-1 has been observed binding  $\alpha 5 \beta 1$  integrin with similar affinity compared to Tie-2 (Fig. 1). This suggests that angiopoietins could be involved in mediating cell adhesion or migration through integrins independent of the Tie-2 receptor<sup>51</sup>. Moreover, in colonic samples from CD and UC patients, intestinal lamina propria mononuclear cells CD19+ B cells expressed more  $\alpha 5$  integrin than normal specimens<sup>52</sup>.

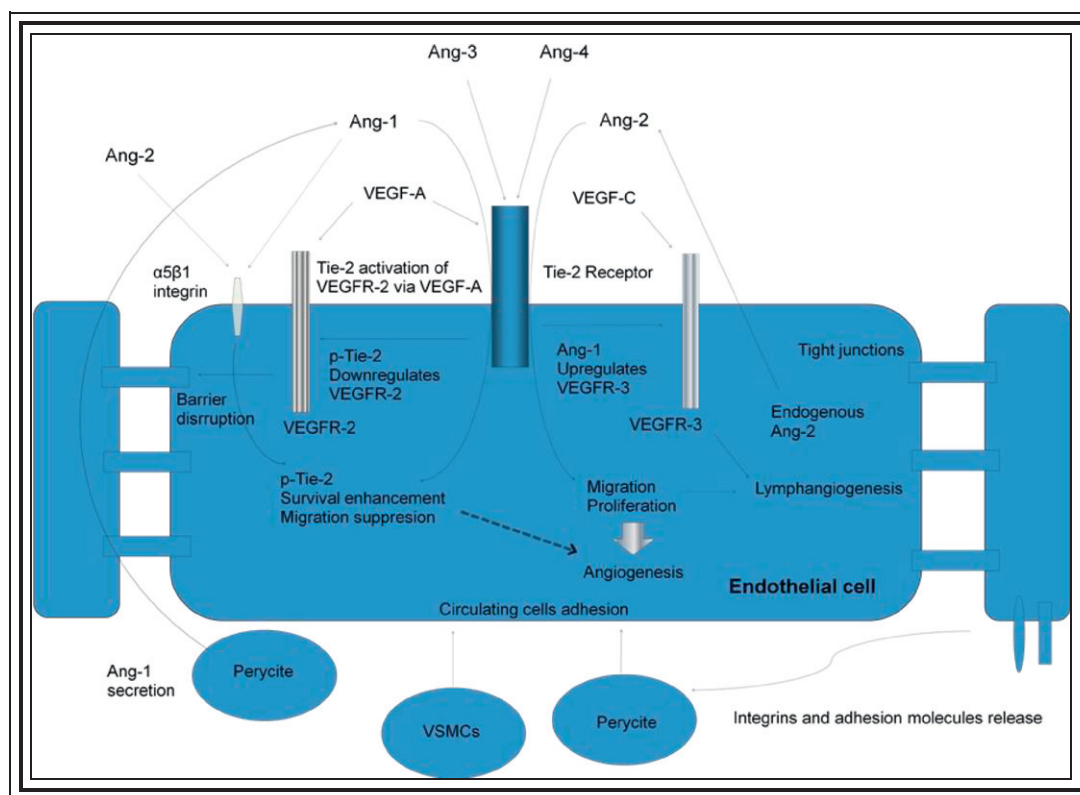
## 2.5. Angiopoietin-2

Another major factor involved in angiogenesis, and discovered by sequence homology to Ang-1, was Ang-2<sup>26</sup>. The functional role of Ang-2 is to act as a competitive antagonist of Ang-1 on ECs and VSMCs. It down-regulates Tie-2 signaling, thereby releasing the vascular endothelium from the strengthening inhibitory influence of Ang-1<sup>53</sup>.

Ang-2 facilitates EC activation in response to VEGF-A and other classic growth factors, and a given pathophysiological condition such as hypoxia<sup>54</sup>. It promotes angiogenesis by allowing ECs to be more responsive to VEGF-A mediated cell proliferation which is necessary for EC repair and turn over<sup>38,39,55</sup>. In the absence of VEGF-A, Ang-2 destabilizes the interaction between ECs and their support cells, causing plasma leakage and promoting vascular regression<sup>26,56–60</sup>.

However, recent studies have demonstrated that the activity of Ang-2 is more complex than previously believed. When it binds Tie-2 without inducing phosphorylation, Ang-2 interrupts essential Ang-1/Tie-2 signaling, acting mainly as a functional antagonist of Ang-1 in an autocrine way<sup>15,22,23,26,42,61</sup>. Such beneficial or detrimental effects on inflammation depend not only on the phosphorylation of the Tie-2 receptor, but also on the duration of its particular receptor binding<sup>37,38,41,62,63</sup>.

Ang-2 shows agonist activity binding Tie-2 in the absence of Ang-1; however, it functions as a dose-dependent antagonist when Ang-1 is present. ECs produce Ang-2 but not Ang-1, and



**Figure 1** Schematic representation of possible Ang/Tie-2 signaling between vascular endothelial and smooth muscle cells and pericytes. Ang-1 multimers bind to Tie-2 on ECs, induces receptor phosphorylation and behave as an anti-inflammatory cytokine. Phosphorylated Tie-2 also down-regulates VEGFR-2 expression. When Ang-1 binds Tie-2 without phosphorylation, VEGFR-3 is up-regulated inducing lymphangiogenesis. Conversely, Ang-2 normally functions as an Ang-1 antagonist and mediates increases in vascular permeability and primes the vasculature for angiogenesis, but it could also function as a partial Tie-2 agonist under certain conditions: without inducing phosphorylation, Ang-2 interrupts Ang-1/Tie-2 signaling. In the absence of Ang-1, Ang-2 shows an agonist activity in a dose-dependent manner, and endogenous Ang-2 maintains Tie-2 activation. Both Ang-1 and Ang-2 can bind  $\alpha 5\beta 1$  integrin similarly to Tie-2. Ang-3 and Ang-4 anchor Tie-2 as agonist and antagonist, respectively, but their exact function remains unclear.

this endogenous Ang-2 maintains EC survival, migration and tube formation. When these cells are stimulated with Ang-1 and -2, Ang-2 dose-dependently inhibits Ang-1-induced EC survival. Although Ang-2 is a weaker agonist than Ang-1, endogenous Ang-2 maintains a level of Tie-2 activation that is critical to a spectrum of EC functions (Fig. 1)<sup>64,65</sup>. This dose-dependent modulation of Ang-2 activity may be important in the regulation of neovessel formation because one ligand can mediate both the initial inhibition of Tie-2 activity necessary for an efficient early angiogenic response, as well as later maturation and stabilization of the neovasculature<sup>28</sup>. This view was challenged by the observation that high level expression of Ang-2 is present in both highly malignant tumors such as glioblastoma multiforme and inflammatory conditions such as psoriasis, IBD and hemangiomas<sup>53,64,66,67</sup>.

Ang-2 activates multiple signaling pathways including reactive oxygen generation. It also plays a role by sensitizing endothelial cells to tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and can exaggerate inflammatory responses<sup>37,68</sup>. In adult human tissues, Ang-2 expression is largely restricted to sites of active vascular remodeling such as ovaries, uterus and placenta, while Ang-1 is more widespread<sup>26</sup>.

## 2.6. Angiopoietin-3/Angiopoietin-4

Very little is known about these ligands. Ang-3 is thought to act as an agonist while Ang-4 exerts an antagonist effect at the Tie-2 receptor (Fig. 1). Their expression patterns also differ, as Ang-3 is expressed throughout the body and Ang-4 is detected only in lung<sup>37,69</sup>. Currently, the exact biological actions and pattern of Tie-2 signaling by Ang-3 and -4 are poorly characterized but their function seems to be cell specific<sup>33,34</sup>.

## 2.7. Angiopoietins and the lymphatic system

Lymphatic vessels, which drain interstitial fluids, and return them back to circulation, are thought to grow following blood capillaries, in order to recover tissue homeostasis<sup>70,71</sup>. Ang-2 is known to be involved in the regulation of embryonic lymphangiogenesis. However, the role of Ang-2 in postnatal pathological lymphangiogenesis, such as inflammation, is largely unknown<sup>72</sup>.

Although several lymphangiogenic factors are known to be involved in the formation of lymphatic vessels, the molecular



mechanisms that maintain lymphatic integrity and control the resolution of inflammation remain unclear. *In vitro* studies revealed that, during inflammation, the stability, integrity and function of lymphatic endothelial cells are enhanced in the presence of Ang-1<sup>73</sup>.

In addition to blood vessel organization, Ang-2 deficiency also influences the development of lymphatic vessels, particularly those within the gastrointestinal system<sup>74</sup>. In this respect, Ang-2 deficient mice have been reported as a relevant model of intestinal lymphatic dysplasia<sup>75</sup>.

## 2.8. Angiopoietins in animal models

Recently, Cho et al.<sup>76</sup> designed an Ang-1 variant, COMP-Ang-1, which was more potent than native Ang-1 in phosphorylating the Tie-2 receptor in lung ECs *in vivo*. After its administration to mice, it was mainly located in microvascular ECs of the intestinal villi and lung. The Ang-1 variant prolonged survival in irradiated mice, showing specific protection against EC injury. There is evidence that Ang-2 deficient mice show complex defects in vascular development and postnatal vascular remodeling<sup>29,77,78</sup>. In IBD mouse models, blockade of Ang-2 with L1-10, an Ang-2-specific inhibitor, significantly inhibited lymphangiogenesis but promoted angiogenesis. These results clearly indicate that Ang-2 acts as a crucial regulator of inflammatory lymphangiogenesis by sensitizing the lymphatic vasculature to inflammatory stimuli, thereby directly promoting lymphangiogenesis<sup>72</sup>.

In the development of experimental IBD in Ang-2(−/−) DSS treated mice, leukocyte infiltration, inflammation and blood and lymphatic vessel density have been shown to be significantly attenuated compared with wild type DSS treated mice. Ang-2 mediates inflammatory angiogenesis, lymphangiogenesis and neutrophil infiltration to reduce some, but not all clinical features of IBD.<sup>5</sup> However, in DSS induced endoglin heterozygous, Eng(+/-) mice model, Ang-1 and Ang-2 levels remained unchanged in the distal colon during DSS induction. In contrast, VEGF-A levels and vascular permeability were increased in the chronic phase of colitis<sup>8</sup>.

## 2.9. Role of angiopoietins in IBD

Koutroubakis et al. first measured circulating serum levels of Ang-2 and Tie-2 in patients with IBD<sup>79</sup>. Both angiogenic factors were slightly elevated in patients with CD and UC compared with controls and Ang-2 also correlated with disease activity. Significantly higher levels of Ang-2 in patients with active IBD compared with patients with non-active disease were found. Both Ang-2 and Tie-2 median serum levels were significantly higher and lower, respectively, in those patients with early disease (diagnosis < 2 years) compared with IBD patients with late disease diagnosis<sup>79</sup>. A second study, where Ang-1 levels were also assessed, supported these observations in CD. In contrast to what resulted in Ang-2 and Tie-2, levels of Ang-1 were lower in patients with CD compared with healthy controls. This imbalance between Ang-1 and Ang-2 may reflect an abnormal process of maturation and stabilization of the vascular network during the course of IBD. Several correlations among angiopoietins and acute-phase reactants were also found<sup>80</sup>.

A later report also suggested that, besides the potential role of angiopoietin circulating levels as disease markers, the

Ang/Tie pathway may play a role in the local progression of UC by studying tissue samples from colonic mucosa<sup>81</sup>. The authors found that epithelia of crypt abscesses were strongly positive for Ang-1 and -2 in samples derived from patients with active UC, though the colorectal epithelium without crypt abscess showed minimal expression of Ang-1, Ang-2, and Tie-2. Specimens from UC patients in remission showed significantly less immunoreactivity for Ang-1, -2, or Tie-2. Therefore, they confirmed that the angiogenic response is induced by Ang-2, in the presence of VEGF-A, blocking the normal vessel-stabilizing effect of Ang-1<sup>81</sup>. These results, the high immunohistochemical expression of Ang-1 in mucosal samples from patients with endoscopically-active UC compared with non-active UC patients, is similar to that of our group's current investigation. Moreover, we also found a high microvessel density in the same high Ang-1-expressing samples from active compared with non-active UC patients. Nevertheless, we have also included patients with CD, but no differences in Ang-1 expression and microvessel density were found when patients with active and inactive CD were compared<sup>82</sup>.

These results concur with those of a large study performed in IBD patients in which CD patients with disease restricted to the colon had significantly lower serum Ang-2 levels in comparison with other phenotype locations, probably due to a transient variability or heterogeneity of endothelial cell characteristics<sup>83,84</sup>. Additionally, the authors found higher serum Ang-1 levels in UC patients who were smokers compared with non-smokers. This increase of serum Ang-1 in smoking UC, but not in CD, patients may be related to the nicotine effect on angiogenesis, which is known to up-regulate VEGF<sup>85,86</sup>. This probably suggests a collaboration between the VEGF and the angiopoietin system in UC which does not occur in CD<sup>80</sup>. On the other hand, no statistically significant difference in serum Ang-1 and -2 levels related to disease duration or activity was established, in contrast with previously reported data for serum Ang-2<sup>83,84</sup>.

Recently, Pousa et al. evaluated serum angiopoietin levels in patients with UC who underwent oral corticosteroid treatment. At baseline, Ang-1 levels were statistically significant lower than those in healthy individuals while Ang-2 levels, together with VEGF-A, were higher than in controls. In the same work, no correlation between angiopoietin levels and clinical activity of UC was found<sup>87</sup>.

In this study, after treatment, patients who achieved complete remission showed statistically significantly higher serum levels of Ang-1 and Ang-2, but not of Tie-2, compared with those that did not achieve remission. Moreover, after completing treatment, Ang-1 and Ang-2 concentrations nearly returned to their baseline levels<sup>87</sup>. Therefore, corticosteroids temporarily alter circulating levels of VEGF and angiopoietins.

We are currently studying the effect of anti-TNF- $\alpha$  treatment on angiopoietin levels in patients with IBD. However, in contrast to the angiopoietin level modification seen during corticosteroid treatment, we have not observed changes in the levels of these factors after treatment. Although Ang-2 can mediate inflammation by up-regulating the response of endothelial cells to TNF- $\alpha$ , the effectiveness of anti-TNF- $\alpha$  treatment appears to not be related to the changes in the levels of these angiogenic factors<sup>88</sup>.

In addition to the potential of the serum angiopoietin system levels as optimal markers of clinical activity, we also

evaluated histological and clinical activity. We studied the angiopoietin system in both serum and culture supernatant of mucosal samples<sup>89,90</sup>. We found that serum Ang-1 levels were higher in patients with endoscopically active IBD compared with non-active ones. In culture supernatant, levels of Ang-1, Ang-2 and Tie-2 were higher in patients with active compared with non-active IBD and Ang-2 levels of patients in remission were even lower than in controls. Probably, during periods of quiescence, lower levels of Ang-2 are released, as the Ang-2-expressing ECs recruitment ends, but the initial angiogenic balance is not totally restored. Also, there was a positive correlation between serum and colonic mucosa culture supernatant levels of Ang-1. Interestingly, we found differences of mucosal Tie-2 levels between affected and non-affected colonic area<sup>89,90</sup>.

Ang-1 concentrations were modified in parallel with the severity of histological lesions, and moderately correlated with clinical and endoscopic activity. Thus, that the measurement of Ang-1 levels in serum may be useful as a non-invasive method should be put cautiously, as the area under the receiver operator Characteristic (ROC) curve for the diagnosis of disease activity for Ang-1 was below 0.7 for serum levels and 0.8 for mucosal culture supernatant<sup>89,90</sup>. Therefore, serum measurement of angiopoietins is not yet completely set up to avoid unnecessary colonoscopies.

### 3. Conclusions

The angiopoietin system is implicated in the regulation of the angiogenic process in sustained inflammation. These factors are also essential for vascular development, maturation and stability. As IBD is triggered by an activation of the immune system characterized by a chronic inflammation located in the gut, disease progression has been shown to be maintained by angiogenesis in a mutually dependent association. Nevertheless, the direct implication of the angiopoietin system in the development of intestinal inflammation is not fully understood. No less important is that until now, most of the studies are focused on the determination of these factors at a circulating level, which present high variability. Taking into account that cellular function and response depend on the surrounding environmental protein network, the exploration of changes in the distribution and association of angiopoietins with the mucosal activity that defines critical events involved in the disease's pathogenesis is required. Therefore, larger-scale studies in patients with IBD are needed to further determine the exact mechanisms that associate inflammation and angiopoietin levels.

### Conflict of interest

There is no conflict of interest.

### Acknowledgments

Pablo M Linares has performed and designed the research study and wrote the paper. María Chaparro and Javier P. Gisbert have contributed to the design of the study.

All authors approved the final version of the manuscript.

### References

1. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1989;170:2–6 [discussion 16–9].
2. Satsangi J, Morecroft J, Shah NB, Nimmo E. Genetics of inflammatory bowel disease: scientific and clinical implications. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:3–18.
3. Sands BE. Inflammatory bowel disease: past, present, and future. *J Gastroenterol* 2007;42:16–25.
4. Shantha Kumara HM, Grieco MJ, Yan X, Kalady MF, DiMaggio V, Kim DG, et al. Minimally invasive colorectal resection for cancer is associated with a short-lived decrease in soluble Tie-2 receptor levels, which may transiently inhibit VEGF-mediated angiogenesis (via altered blood levels of free Ang-1 and Ang-2). *Surg Endosc* 2010;24:2581–7.
5. Ganta VC, Cromer W, Mills GL, Traylor J, Jennings M, Daley S, et al. Angiopoietin-2 in experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009;16:1029–39.
6. Pousa ID, Mate J, Gisbert JP. Angiogenesis in inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Invest* 2008;38:73–81.
7. Felmeden DC, Blann AD, Lip GY. Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease. *Eur Heart J* 2003;24:586–603.
8. Jerkic M, Peter M, Ardelean D, Fine M, Konerding MA, Letarte M. Dextran sulfate sodium leads to chronic colitis and pathological angiogenesis in Endoglin heterozygous mice. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:1859–70.
9. Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J* 1997;11:457–65.
10. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029–39.
11. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med* 2003;3:643–51.
12. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1:27–31.
13. Dachs GU, Tozer GM. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer* 2000;36:1649–60.
14. Giatromanolaki A, Sivridis E, Maltezos E, Papazoglou D, Simopoulos C, Gatter KC, et al. Hypoxia inducible factor 1alpha and 2alpha overexpression in inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol* 2003;56:209–13.
15. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003;9:653–60.
16. Autiero M, Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb Haemost* 2003;1:1356–70.
17. Goebel S, Huang M, Davis WC, Jennings M, Siahaan TJ, Alexander JS, et al. VEGF-A stimulation of leukocyte adhesion to colonic microvascular endothelium: implications for inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G648–54.
18. Chidlow Jr JH, Langston W, Greer JJ, Ostanin D, Abdelbaqi M, Houghton J, et al. Differential angiogenic regulation of experimental colitis. *Am J Pathol* 2006;169:2014–30.
19. Hatoum OA, Heidemann J, Binion DG. The intestinal microvasculature as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1072:78–97.
20. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005;438:932–6.
21. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;407:242–8.

22. Eklund L, Olsen BR. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp Cell Res* 2006;**312**:630–41.
23. Fiedler U, Krissl T, Koidl S, Weiss C, Koblizek T, Deutsch U, et al. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 share the same binding domains in the Tie-2 receptor involving the first Ig-like loop and the epidermal growth factor-like repeats. *J Biol Chem* 2003;**278**:1721–7.
24. Wong AL, Haroon ZA, Werner S, Dewhirst MW, Greenberg CS, Peters KG. Tie2 expression and phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res* 1997;**81**:567–74.
25. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996;**87**:1161–9.
26. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science* 1997;**277**:55–60.
27. Brindle NP, Saharinen P, Alitalo K. Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. *Circ Res* 2006;**98**:1014–23.
28. Fam NP, Verma S, Kutryk M, Stewart DJ. Clinician guide to angiogenesis. *Circulation* 2003;**108**:2613–8.
29. Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J, et al. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by angiopoietin-1. *Dev Cell* 2002;**3**:411–23.
30. Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;**10**:165–77.
31. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;**87**:1171–80.
32. Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, et al. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1999;**286**:2511–4.
33. Lee HJ, Cho CH, Hwang SJ, Choi HH, Kim KT, Ahn SY, et al. Biological characterization of angiopoietin-3 and angiopoietin-4. *FASEB J* 2004;**18**:1200–8.
34. Tsigkos S, Koutsilieris M, Papapetropoulos A. Angiopoietins in angiogenesis and beyond. *Expert Opin Investig Drugs* 2003;**12**: 933–41.
35. Sundberg C, Kowanzetz M, Brown LF, Detmar M, Dvorak HF. Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis *in vivo*. *Lab Invest* 2002;**82**:387–401.
36. London NR, Whitehead KJ, Li DY. Endogenous endothelial cell signaling systems maintain vascular stability. *Angiogenesis* 2009;**12**:149–58.
37. Fiedler U, Augustin HG. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol* 2006;**27**:552–8.
38. Kim I, Kim JH, Moon SO, Kwak HJ, Kim NG, Koh GY. Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *Oncogene* 2000;**19**:4549–52.
39. Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**:11205–10.
40. Oshima Y, Oshima S, Nambu H, Kachi S, Takahashi K, Umeda N, et al. Different effects of angiopoietin-2 in different vascular beds: new vessels are most sensitive. *FASEB J* 2005;**19**:963–5.
41. Roviezzo F, Tsigkos S, Kotanidou A, Bucci M, Brancialeone V, Cirino G, et al. Angiopoietin-2 causes inflammation *in vivo* by promoting vascular leakage. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;**314**:738–44.
42. Scharpfenecker M, Fiedler U, Reiss Y, Augustin HG. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *J Cell Sci* 2005;**118**: 771–80.
43. Simoes DC, Vassilakopoulos T, Toumpanakis D, Petrochilou K, Roussos C, Papapetropoulos A. Angiopoietin-1 protects against airway inflammation and hyperreactivity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;**177**:1314–21.
44. Lee KS, Lee KY, Kim SR, Park HS, Park SJ, Min KH, et al. Blockade of airway inflammation and hyper-responsiveness by an angiopoietin-1 variant, COMP-Ang1. *Exp Mol Med* 2007;**39**: 733–45.
45. Pizurki L, Zhou Z, Glynos K, Roussos C, Papapetropoulos A. Angiopoietin-1 inhibits endothelial permeability, neutrophil adherence and IL-8 production. *Br J Pharmacol* 2003;**139**: 329–36.
46. Kim I, Moon SO, Park SK, Chae SW, Koh GY. Angiopoietin-1 reduces VEGF-stimulated leukocyte adhesion to endothelial cells by reducing ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression. *Circ Res* 2001;**89**:477–9.
47. Neagoe PE, Brkovic A, Hajjar F, Sirois MG. Expression and release of angiopoietin-1 from human neutrophils: intracellular mechanisms. *Growth Factors* 2009;**27**:335–44.
48. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997;**277**:48–50.
49. Jones N, Iljin K, Dumont DJ, Alitalo K. Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;**2**:257–67.
50. Dallabrida SM, Ismail NS, Pravda EA, Parodi EM, Dickie R, Durand EM, et al. Integrin binding angiopoietin-1 monomers reduce cardiac hypertrophy. *FASEB J* 2008;**22**:3010–23.
51. Weber CC, Cai H, Ehrbar M, Kubota H, Martiny-Baron G, Weber W, et al. Effects of protein and gene transfer of the angiopoietin-1 fibrinogen-like receptor-binding domain on endothelial and vessel organization. *J Biol Chem* 2005;**280**:22445–53.
52. Yacyszyn OK, Lai PF, Forse K, Teichert-Kuliszewska K, Jurasz P, Stewart DJ. Tyrosine phosphatase beta regulates angiopoietin-Tie2 signaling in human endothelial cells. *Angiogenesis* 2009;**12**: 25–33.
53. Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, et al. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med* 2006;**12**:235–9.
54. Nilsson I, Shibuya M, Wennstrom S. Differential activation of vascular genes by hypoxia in primary endothelial cells. *Exp Cell Res* 2004;**299**:476–85.
55. Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999;**18**: 5356–62.
56. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006;**441**: 437–43.
57. Boussat S, Eddahibi S, Coste A, Fatacciolli V, Gouge M, Housset B, et al. Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in human pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;**279**:L371–8.
58. Park JH, Park KJ, Kim YS, Sheen SS, Lee KS, Lee HN, et al. Serum angiopoietin-2 as a clinical marker for lung cancer. *Chest* 2007;**132**: 200–6.
59. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003;**9**:685–93.
60. Chen JX, Zeng H, Reese J, Aschner JL, Meyrick B. Overexpression of angiopoietin-2 impairs myocardial angiogenesis and exacerbates cardiac fibrosis in the diabetic db/db mouse model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012 Feb 15;**302**(4):H1003–12.
61. Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, Hegen A, Grunow V, Schmidt JM, et al. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel–Palade bodies. *Blood* 2004;**103**:4150–6.
62. Mochizuki Y, Nakamura T, Kanetake H, Kanda S. Angiopoietin 2 stimulates migration and tube-like structure formation of murine



- brain capillary endothelial cells through c-Fes and c-Fyn. *J Cell Sci* 2002;**115**:175–83.
63. Teichert-Kuliszewska K, Maisonpierre PC, Jones N, Campbell AI, Master Z, Bendeck MP, et al. Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovasc Res* 2001;**49**:659–70.
  64. Daly C, Pasnikowski E, Burova E, Wong V, Aldrich TH, Griffiths J, et al. Angiopoietin-2 functions as an autocrine protective factor in stressed endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**:15491–6.
  65. Yuan HT, Khankin EV, Karumanchi SA, Parikh SM. Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium. *Mol Cell Biol* 2009;**29**:2011–22.
  66. Lind AJ, Wikstrom P, Granfors T, Egevad L, Stattin P, Bergh A. Angiopoietin 2 expression is related to histological grade, vascular density, metastases, and outcome in prostate cancer. *Prostate* 2005;**62**:394–9.
  67. Brown LF, Dezube BJ, Tognazzi K, Dvorak HF, Yancopoulos GD. Expression of Tie1, Tie2, and angiopoietins 1, 2, and 4 in Kaposi's sarcoma and cutaneous angiosarcoma. *Am J Pathol* 2000;**156**:2179–83.
  68. Makinde TO, Agrawal DK. Increased expression of angiopoietins and Tie2 in the lungs of chronic asthmatic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010;**44**:384–93.
  69. Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, Aldrich TH, Jones PF, Zhou H, et al. Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;**96**:1904–9.
  70. Linares PM, Gisbert JP. Role of growth factors in the development of lymphangiogenesis driven by inflammatory bowel disease: a review. *Inflamm Bowel Dis* 2011;**17**:1814–21.
  71. Saharinen P, Petrova TV. Molecular regulation of lymphangiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2004;**1014**:76–87.
  72. Yan ZX, Jiang ZH, Liu NF. Angiopoietin-2 promotes inflammatory lymphangiogenesis and its effect can be blocked by the specific inhibitor L1-10. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;**302**:H215–23.
  73. Kajiya K, Kidoya H, Sawane M, Matsumoto-Okazaki Y, Yamanishi H, Furuse M, et al. Promotion of lymphatic integrity by angiopoietin-1/Tie2 signaling during inflammation. *Am J Pathol* 2011;**180**(3):1273–82.
  74. Dellinger M, Hunter R, Bernas M, Gale N, Yancopoulos G, Erickson R, et al. Defective remodeling and maturation of the lymphatic vasculature in angiopoietin-2 deficient mice. *Dev Biol* 2008;**319**:309–20.
  75. Shimoda H, Bernas MJ, Witte MH, Gale NW, Yancopoulos GD, Kato S. Abnormal recruitment of periendothelial cells to lymphatic capillaries in digestive organs of angiopoietin-2-deficient mice. *Cell Tissue Res* 2007;**328**:329–37.
  76. Cho CH, Kammerer RA, Lee HJ, Steinmetz MO, Ryu YS, Lee SH, et al. COMP-Ang1: a designed angiopoietin-1 variant with nonleaky angiogenic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:5547–52.
  77. Gale NW, Thurston G, Davis S, Wiegand SJ, Holash J, Rudge JS, et al. Complementary and coordinated roles of the VEGFs and angiopoietins during normal and pathologic vascular formation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2002;**67**:267–73.
  78. Veikkola T, Alitalo K. Dual role of Ang2 in postnatal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Dev Cell* 2002;**3**:302–4.
  79. Koutroubakis IE, Xidakis C, Karmiris K, Sfiridaki A, Kandidaki E, Kouroumalis EA. Potential role of soluble angiopoietin-2 and Tie-2 in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Invest* 2006;**36**:127–32.
  80. Pousa ID, Mate J, Salcedo-Mora X, Abreu MT, Moreno-Otero R, Gisbert JP. Role of vascular endothelial growth factor and angiopoietin systems in serum of Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2008;**14**:61–7.
  81. Yoshizaki A, Nakayama T, Naito S, Sekine I. Expression patterns of angiopoietin-1, -2, and tie-2 receptor in ulcerative colitis support involvement of the angiopoietin/tie pathway in the progression of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2009;**54**:2094–9.
  82. Linares PM, Fernández-Contreras ME, Algaba A, Guijarro Rojas M, Bermejo F, Chaparro M, et al. Immunohistochemical expression of angiopoietin 1 (Ang1) and microvessels density in colon of patients with inflammatory bowel disease (IBD). *J Crohns Colitis* 2012;**6**:S21–2.
  83. Koutroubakis IE, Xidakis C, Karmiris K, Sfiridaki A, Kandidaki E, Kouroumalis EA. Serum angiogenin in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2004;**49**:1758–62.
  84. Oikonomou KA, Kapsoritakis AN, Kapsoritaki AI, Manolakis AC, Tiaka EK, Tsiopoulos FD, et al. Angiogenin, angiopoietin-1, angiopoietin-2, and endostatin serum levels in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2010;**17**:963–70.
  85. Martin JW, Mousa SS, Shaker O, Mousa SA. The multiple faces of nicotine and its implications in tissue and wound repair. *Exp Dermatol* 2009;**18**:497–505.
  86. Wu WK, Cho CH. The pharmacological actions of nicotine on the gastrointestinal tract. *J Pharmacol Sci* 2004;**94**:348–58.
  87. Pousa ID, Algaba A, Linares PM, Sanz-Cameno P, Mate J, Moreno-Otero R, et al. Corticosteroids modulate angiogenic soluble factors in ulcerative colitis patients. *Dig Dis Sci* 2010;**56**:871–9.
  88. Algaba A, Linares PM, Fernández-Contreras ME, Figuerola A, Calvet X, Guerra I, et al. The effect of infliximab and adalimumab treatment on angiogenic factor levels in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *J Crohns Colitis* 2012;**6**:S27.
  89. Algaba A, Linares PM, Fernández-Contreras ME, Ordoñez A, Trápaga J, Guerra I, et al. Relationship between histological activity of inflammatory bowel disease (IBD) and angiogenic and lymphangiogenic factors (ALF). *J Crohns Colitis* 2012;**6**:S31.
  90. Linares PM, Algaba A, Fernández-Contreras ME, Guerra I, Chaparro M, Rodríguez-Agulló JL, et al. Relationship between levels of angiogenic and lymphangiogenic factors (ALF) and the extension, endoscopic activity, and acute phase reactants (APR) in patients with ulcerative colitis (UC). *J Crohns Colitis* 2012;**6**:S30–1.